

Prakash Chandra

DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT DER
NUKLEINSÄUREN BEI DER
PROTEINSYNTHESE IN VITRO

1965

Frankfurt am Main 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546413_0090



Druck: Bildstelle der J.W. Goethe-Universität
Frankfurt a.M.

DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT DER NUKLEINSÄUREN

BEI DER PROTEINSYNTHESE IN VITRO.

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

eingereicht von
PRAKASH CHANDRA

Frankfurt am Main

1965

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. H. Lehmann
1. Gutachter: Prof. Dr. G. Pfleiderer
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Wacker

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1965

In Dankbarkeit
Otto, Marlies und Tara

und

dem Gedenken meines Vaters
gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

1. EINLEITUNG	1
1.1 Einführung in die Arbeit und Aufgabenstellung.	4
1.2 Gliederung der Arbeit.	11
1.3 Abkürzungen.	12
2. BEEINFLUSSUNG DER PROTEINSYNTHESE DURCH UV-LICHT.	
2.1 Überblick.	14
2.2 Aufgabenstellung.	20
2.3 Ergebnisse und Diskussion.	21
3. PHOTODYNAMISCHE BEEINFLUSSUNG DER PROTEINSYNTHESE.	
3.1 Überblick und Aufgabenstellung.	44
3.2 Ergebnisse und Diskussion.	48
4. DIE EINWIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN AUF DIE PROTEIN- SYNTHESE.	
4.1 Überblick und Aufgabenstellung.	54
4.2 Ergebnisse und Diskussion.	58
5. EINWIRKUNG VON NEUTRONEN AUF DIE PROTEINSYNTHESE.	
5.1 Überblick und Aufgabenstellung.	64
5.2 Ergebnisse und Diskussion.	67
6. METHODIK	
6.1 Durchführung der Bestrahlungen.	72
6.2 Herstellung von zellfreiem Extrakt aus <u>E.coli</u> .	73
6.3 Isolierung der Transfer RNS aus <u>E. coli</u> .	74
6.4 Herstellung von Aminoacyl-Transfer-RNS.	75
6.5 Synthese der Polynukleotide.	76
6.6 Einbau der Aminosäuren.	78
6.7 Elektrophoretische und Chromatographische Trennung der Nukleinsäurebasen.	79

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.	80
8. SCHLUSSBETRACHTUNG.	88
LITERATURVERZEICHNIS	89

1. Einleitung

Die geringe Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Röntgenstrahlen ist ein Grund dafür, daß es bisher noch nicht gelungen ist, mit Hilfe einer radioaktiven Strahlenquelle Heil- oder Lebensmittel zu sterilisieren. Setzt man dagegen Bakterien dem kurzwelligen UV-Licht aus, so sind in kürzester Zeit nahezu alle Zellen tot. Daraus läßt sich folgern, daß der Mechanismus der Strahlenwirkung von UV- und Röntgenstrahlen verschieden ist, was aber nicht ausschließt, daß der Angriffspunkt in der Zelle der gleiche ist. Dieser Angriffspunkt ist das genetische Material, die DNS und in besonderen Fällen die RNS als der Träger der genetischen Information. Dies bedeutet also, daß die Strahlen direkt oder indirekt auf die DNS einwirken müssen, um mutagen oder letalmutagen wirksam zu sein.

Beide Nukleinsäuren entfalten ihre Wirkung durch die Synthese von Enzymen. Durch die Arbeiten von NIRENBERG und MATTHAEI und denen der Arbeitsgruppe von OCHOA wissen wir, in welcher Weise die Nukleinsäuren Eiweißmoleküle aufbauen. Durch die Arbeiten aus unserem Institut und denen anderer Arbeitsgruppen gelang es uns in den letzten Jahren, die strahlenchemische Veränderung der Nukleinsäuren durch Röntgenstrahlen, UV-Licht und sichtbares Licht näher zu erfassen. Es war daher naheliegend, die Einwirkung der verschiedenen Strahlenarten auf die Proteinsynthese *in vitro* zu untersuchen.

Da jede Aminosäure durch die Art und Anordnung von drei Nuk-

leinsäurebasen festgelegt ist, (es sei hier einmal von der Degeneriertheit des Codes abgesehen) war damit zu rechnen, daß die strahlenchemische Veränderung einer dieser Basen den Einbau einer Aminosäure in das Eiweiß beeinflußt. Da wir die strahlenchemische Veränderung der Basenbausteine weitgehend kennen, war eine Voraussage des Strahleneffektes in dem einfachen System der Proteinsynthese nach NIRENBERG und MATTHAEI teilweise möglich. Wesentlicher erschien es aber, bei den Untersuchungen ein Hinweis für einen Anticodex in der t-RNS zu erhalten. Nachdem die Grundregel der Nukleinsäure-Mechanismen anscheinend auf der Basenpaarung Adenin-Thymin bzw. Guanin-Cytosin beruht, war es naheliegend, diesen Basenpaarungsgrundsatz auch für die Weitergabe der Information bei der Proteinsynthese anzuwenden. Danach sollte sich in der "Schlaufe" der t-RNS der Anticodex zum Code der messenger-RNS (m-RNS) befinden. Da die Basenbausteine durch die Strahlenarten unterschiedlich, teilweise sehr spezifisch, verändert bzw. nicht verändert werden, waren die experimentellen Voraussetzungen dieser Art der Untersuchungen gegeben. Bei der dritten Nukleinsäure, die für die Proteinsynthese notwendig ist, nämlich der ribosomalen RNS, war weniger damit zu rechnen, daß ihre strahlenchemische Veränderung spezifische Rückschlüsse auf den Mechanismus der Proteinsynthese zulassen würde.

Nach dem heutigen Stand der experimentellen Technik kann man die zellfreie Proteinsynthese nur teilweise mit reinen, definierten Nukleinsäuren bzw. Enzymen durchführen. Daraus ergibt sich, daß der Aussagewert dieser Untersuchungen vielleicht mit

Ausnahme der Bestrahlung der m-RNS nach Wiederholung mit dem reinen System noch erhöht wird. Trotzdem muß man annehmen, daß die strahlenchemischen Veränderungen der verschiedenen an der Proteinsynthese beteiligten Nukleinsäuren einen Einblick in den Reaktionsablauf der Proteinsynthese gewährt.

1.1. Einführung in die Arbeit und Aufgabenstellung

Im Jahre 1871 beschrieb der schweizer Arzt FRIEDERICH MIESCHER, in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für medizinische Chemie ³⁹⁾, seine Entdeckung der Nukleinsäuren. Sein Ausgangsprodukt war Eitermaterial aus Bandagen der Tübinger Chirurgischen Klinik.

Die chemischen Eigenschaften dieser Nukleinsäuren waren so neuartig, daß Hoppe-Seyler darauf bestand, MIESCHERS Versuche vor der Publikation selbst zu wiederholen. Schon bald wurden die chemischen Kenntnisse über die Nukleinsäuren ständig vermehrt. Man lernte die Desoxyribonukleinsäure (DNS) von der Ribonukleinsäure (RNS) zu unterscheiden, und die chemische Analyse der DNS ergab folgendes: Desoxyribose, ein Zucker und Phosphorsäure bilden als sich abwechselnde Kettenglieder ein langes Kettenmolekül.

Jeder Zuckerrest trägt eine von vier möglichen organischen Basen, nämlich: Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin. Zucker, Phosphorsäure und Basen bilden als Mononukleotid die Grundbausteine des Moleküls, welches sich als Polynukleotid aus tausenden derartiger Mononukleotide zusammensetzt (Abb. 1).

Das DNS-Molekül wurde neben chemischen- auch Röntgen-Strukturuntersuchungen unterworfen. Durch Röntgenuntersuchungen gelang es 1953 WATSON und CRICK ⁷⁶⁾ die Doppelhelix-Struktur des DNS-Moleküls festzustellen. Sie zeigten, daß das DNS-Molekül nicht

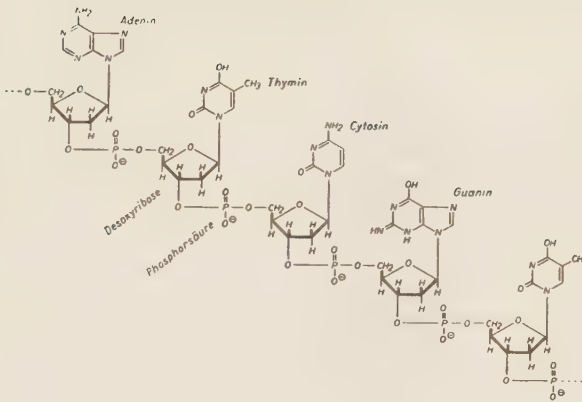
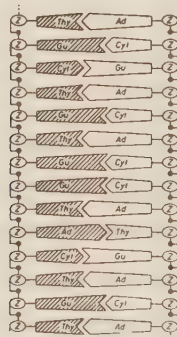
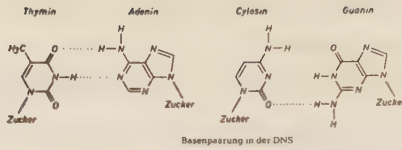


Abb.1 Desoxyribonukleinsäure (Ausschnitt).
aus Wacker, Dtsch. med Wochenschr. 86, 735 (1961)

aus einer, sondern aus zwei Wendeln besteht, die ineinander-
gedreht und durch Sprossen miteinander verbunden sind. In
jeder Sprosse stehen sich zwei Basen (Abb. 2, Seite 6), näm-
lich Adenin und Thymin oder Cytosin und Guanin gegenüber.
Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Cytosin (C) und Guanin (G) fin-
den zueinander durch ihre Fähigkeit, miteinander zwei bzw.
drei spezifisch gelagerte Wasserstoffbrücken zu bilden. Durch
diese Anordnung der spezifischen Basenpaarung A - T bzw. C - G
wird CHARGAFFS ^{13, 64}) Befund vom Jahre 1950 über die zahlen-
mäßige Gleichheit von A und T bzw. C und G zum entscheidenden



Anordnung der Basenbausteine in der DNS

Abb 2 Basenpaarung und Anordnung der Basenbausteine in der DNS.
nach Wacker, Dtsch. med. Wochenschr. 86, 735 (1961)

Strukturelement, das die Fähigkeit des Moleküls zur identischen Reproduktion erklären soll. Die Struktur des DNS-Moleküls erklärt die Fähigkeit der Gene zur Reduplikation. Das Bauprinzip des genetischen Tonbandes ergibt sich ohne weitere chemische Feinarbeit aus einem Umstand: Die Reihenfolge der Basen in der Molekülkette ist beliebig. Die vier Basen A, G, C und T ergeben als Informationszeichen unterschiedliche Informationen durch unterschiedliche Anordnung.

Betrachtet man die genetische Information der DNS als eine

verschlüsselte Kurzschrift und die Proteinstruktur als deren ausgeschriebenes Bild, kann ein Vergleich der DNS-Basensequenz mit der Struktur des abhängigen Proteins zur Entschlüsselung des genetischen Codes führen.

Das Proteinmolekül besitzt wie die Polynukleotidketten der Nukleinsäuremoleküle einen kettenartigen Aufbau. Zahlreiche Aminosäuren werden durch Peptidbindung zu Polypeptidketten verbunden. Eine oder mehrere Polypeptidketten bilden ein Proteinmolekül. Wie im Polynukleotid die Basen, so sind im Polypeptid die Aminosäuren linear angeordnet. SANGERS⁵²⁻⁵⁴⁾ Sequenzanalyse des Insulins ergab 1955 den ersten Beweis, daß die Spezifität eines Proteins durch die Sequenz seiner Aminosäuren festgelegt wird. Beim naheliegenden Gedanken, die spezifische Sequenz der Basenformle in die spezifische Sequenz der Aminosäuren umzusetzen, stößt man auf eine Schwierigkeit. Während die DNS nur vier verschiedene Basen, nämlich A, C, G und T besitzt, setzen sich die Proteine aus etwa 20 Informationszeichen, d. h. 20 verschiedenen Aminosäuren, zusammen. Wenn diese 20 Aminosäuren tatsächlich durch die vier Basen der DNS determiniert werden, müßten die Basen der DNS in Sequenzgruppen zu Codewörtern für jeweils eine Aminosäure zusammengefaßt sein. Die Bildung von Dubletts aus vier Basen führt zu 16 Informationsmöglichkeiten. Drei Basen zu Tripletts gruppiert, ergeben bereits 64 Möglichkeiten.

Das Ergebnis scharfsinniger, genetischer Experimente durch CRICK^{14, 15)}, BRENNER¹⁰⁾ und WALL⁷⁵⁾ zeigt, daß die Infor-

mation der DNS wahrscheinlich in einem Triplet-Code niedergelegt ist. Noch im Sommer 1961 glaubte niemand, daß es so bald gelingen würde, die Zusammensetzung der Basentriplets für die bestimmte Aminosäure zu ermitteln, als neue Ergebnisse der Proteinbiosynthese in vitro zu einer raschen Wendung führten.

Das Studium der Proteinbiosynthese im Reagenzglas, statt in vivo, hat zum Ziel, die komplette "Proteinfabrik" der Zelle in ihre einzelnen Bestandteile zu fraktionieren, deren Funktionen zu untersuchen und schließlich - zum krönenden Abschluß - die einzelnen Bestandteile wieder zum funktionsfähigen Ganzen zusammenzufügen.

Noch ist dies nicht vollständig geglückt, noch ist offenbar niemand in der Lage, ein Protein mit biologischer Funktion in vitro zu synthetisieren. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitskreise^{21-23, 65)} brachten jedoch wichtige Erkenntnisse über die Funktion der DNS-Matritze bei der Proteinbiosynthese. Zunächst werden am DNS-Molekül sogenannte Messenger- oder Botschafter-RNS-Moleküle (m-RNS) synthetisiert, welche die entsprechende Basensequenz wie die DNS haben. Ob die Information in Doppelstrang oder Einzelstrang abgegriffen wird, ist noch nicht aufgeklärt. Die RNS-Moleküle haben ein niedrigeres Molekulargewicht als DNS und die Base Thymin ist durch Uracil ersetzt. Außerdem besteht das RNS-Molekül nicht aus einem Doppel-, sondern nur einem Einzelstrang, wodurch es flexibler wird. Die m-RNS wird in der Zelle vom Ort der DNS in den Chromomeren zum

Ort der Proteinbiosynthese, d. h. zu den Ribosomen im Plasma befördert. Dort wirkt sie als Matrize im zweiten Schritte der Proteinsynthese, der Transcription. Entlang der RNS-Matrix werden Polypeptide mit spezifischer Sequenz synthetisiert. Die Erkennung der richtigen Aminosäuren erfolgt durch Zwischenschaltung niedermolekularer t-RNS. Wichtig ist, daß die Proteinbiosynthese auf zwei Wegen stimuliert werden kann, entweder durch DNS, die ihrerseits zunächst m-RNS produzieren muß, oder aber direkt durch m-RNS mit einer der DNS entsprechenden Basensequenz. Im Jahre 1961 berichteten NIRENBERG und MATTHAEI ⁴³⁾ über ein aufsehererregendes Experiment. Es war gelungen, mit einem Polyribonukleotid (Polyuridylsäure) als niedermolekularer m-RNS eine Polypeptid-Biosynthese in vitro auszulösen: So wie das eingesetzte Polyribonukleotid entlang seiner Kette nur eine Base, nämlich Uracil, aufwies, war die synthetisierte Polypeptidkette ausschließlich aus der Aminosäure Phenylalanin aufgebaut. Die Basensequenz U U U mußte demnach das Codewort für Phenylalanin sein. Jetzt überstürzten sich die Ereignisse. NIRENBERG'S und OCHOA'S Arbeitsgruppen stellten Polyribonukleotide der verschiedensten Basenzusammensetzungen her, und bis in die letzte Zeit gab es in der einschlägigen Literatur etwas, was man als den "Code des Monats" bezeichnen konnte.

<u>Aminosäure</u>	<u>NIRENBERG</u> 43)	<u>OCHOA</u> 46)	<u>NIRENBERG</u> 27)	<u>OCHOA</u> ++
Alanin (Ala)	UGC	CUG	CCG	CCG, CCA
Arg.	UGC	GUC	CGC	AAG, CCG
Asp.		GUA		GUA
AspN.		CUA	UAC, UAA	AAU, AAC
CyS			UUG, UGG?	GUU
CySH	UGG, UUG	UGU		UGU
Clu.	UGA	AUG	AAG	AAG
GluN.		UCG		AAG, AAC
Gly.	UGG	GUG	UGG?	AGG
His		AUC	ACC	AUC
Ileu.	UUA	UUA	UAA	AUU
Leu.	UUG, UUC	UAC	GUU	AUU
Lys.	UAA	AUA	CAA, GAA	AAA
Met.	UGA	UGA	UGA	UGA
Phe.	UUU	UUU	UUU	UUU
Pro.	UCC	CCU	CCC, CCA	CCC
Ser.	UUC? UCG	UUC? UCC	UCC	UCC, CCU
Thr.		UCA	CCA	CCG
Try.	UGG	UGG	UGG	UGG
Tyr.	UUA	UUA	UUA	UUA
Val.	UUG	UUG	UUG	UUG

Weitere Untersuchungen über den genetischen Code sind im Gange. Noch weiß man z. B. nicht, wie die absolute Sequenz der Basen innerhalb der Tripletts aussieht. UUA könnte auch UAU oder AUU heißen. Man ist in der Lage, Basen der Nukleinsäuren ge-

zielt in andere umzuwandeln. Damit ändert sich die Sequenz und es entsteht eine Mutation ^{77a)}. Versuche dieser Art haben zur Aufklärung des genetischen Codes beigetragen. Niemand wäre jedoch in der Lage unter den vielen, jene Basen herauszufinden, die für die gewünschte Eigenschaft verändert werden müßten. Nachdem in den vergangenen Jahren die strahlenschemischen sowie auch photodynamischen Veränderungen der Nukleinsäurebasen eingehender untersucht worden sind, ist es von Interesse, zu sehen, wie sich solche Veränderungen bei Codonen in der Proteinsynthese auswirken.

Der übergeordnete Leitgedanke der vorliegenden Arbeit war demzufolge ein Beitrag zur Aufklärung des genetischen Codes durch die Basenveränderungen der Nukleinsäuren unter dem Einfluß von UV-Licht oder Röntgen- und Neutronenstrahlen oder der photodynamischen Einwirkung von Farbstoffen. Experimente, die unter diesem Gesichtspunkt durchgeführt werden, könnten zeigen, daß die Beeinflussung der Proteinbiosynthese durch UV-Licht, Röntgen- oder Neutronenstrahlen oder durch die Einwirkung photodynamische wirksamer Sensibilisatoren auf Basenveränderungen verschiedener Ribonukleinsäuren beruht.

1. 2. Gliederung der Arbeit

Die Ergebnisse der Arbeit werden in vier Abschnitten geschildert:

Beeinflussung der Proteinsynthese durch UV-Licht.

Röntgenempfindlichkeit der Proteinsynthese in vitro.

Beeinflussung der Proteinsynthese durch Neutronen.

Photodynamische Beeinflussung der Proteinsynthese.

Die einzelnen Abschnitte sind unterteilt in:

- .1 Überblick
- .2 Aufgabenstellung
- .3 Ergebnisse und Diskussion

Experimenteller Teil, Diskussion der gesamten Ergebnisse und Zusammenfassung werden getrennt nach dem letzten Abschnitt geschildert.

1.3. Abkürzungen

Es werden teilweise folgende Abkürzungen benutzt:

RNS	Ribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
m-RNS	messenger-RNS
t-RNS	transfer-RNS
r-RNS	ribosomale RNS
Poly-U	Polyuridylsäure
Poly-A	Polyadenylsäure
Poly-C	Polycytidylsäure
Poly-UA	Copolymer von Uridyl- und Adenylsäure
ADP	Adenosindiphosphat
UDP	Uridindiphosphat
CDP	Cytidindiphosphat
GDP	Guanosindiphosphat

ATP	Adenosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TCE	Trichloressigsäure
TFE	Trifluoressigsäure
PPO	2,5 Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2 (5-Phenyloxazolyl)-benzene
Asp.	Asparaginsäure
AspN	Asparagin
CyS	Cystin
CySH	Cystein
Glu.	Glutamsäure
GluN	Glutamin
Gly.	Glycin
His.	Histidin
Ileu.	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met.	Methionin
Phe.	Phenylalanin
Pro.	Prolin
Ser.	Serin
Thr.	Threonin
Tyr.	Tryptophan
Val.	Valin
DEAE-	diäthylaminoäthyl

2. Beeinflussung der Proteinsynthese durch UV-Licht.

2.1. Überblick

Bereits am Ende des vorigen Jahrhunderts wurden einfache Bestrahlungsversuche mit lebenden Organismen durchgeführt ³²⁾. Die ersten Versuche beschränkten sich jedoch darauf, morphologisch erkennbare biologische Veränderungen, z. B. die Verzögerung der Knospungsrate und des Sporulationsvermögens bei Hefe ^{11, 48)} zu erfassen. Erste Ansätze, tiefer in dieses Gebiet einzudringen, zeigte die 1922 von DESSAUER ¹⁶⁾ aufgestellte "Treffer-Theorie", mit der eine physikalisch-mathematische Erfassung der Inaktivierungsversuche bei Mikroorganismen versucht wurde.

Nur mit physikalischen und biologischen Methoden war es jedoch nicht möglich, die Strahlenwirkungen genauer zu deuten. Für verschiedene Effekte, z. B. für die Reaktivierungsprozesse durch Temperatur, Licht etc., konnten keine Erklärungen gegeben werden.

Erst durch die zunehmenden Erkenntnisse über die Biochemie des Zellgeschehens, hauptsächlich aber durch die großen Fortschritte auf dem Gebiet der Nukleinsäurechemie, wurden die Erkenntnisse über die Wirkung der Strahlen bemerkenswert erweitert.

Erste Untersuchungen über die UV-Strahlenempfindlichkeit der Nukleinsäurebasen wurden 1924 von BASS ²⁾ durchgeführt. Er

stellte fest, daß wässerige Pyrimidin-Lösungen durch UV-Licht wesentlich rascher verändert werden als Purin-Lösungen. BASS nahm eine Zerstörung des heterocyclischen Ringes durch UV-Bestrahlung an.

1949 machten SINSHEIMER und HASTINGS ⁵⁸⁾ eine entscheidende Entdeckung. Uracil in wässriger Lösung bestrahlt, reagierte unter Abnahme der Extinktion. Durch Erhitzen der Lösung auf 100°C oder Ansäuren auf pH 1 konnte ein Teil der Extinktion wieder zurückerhalten werden. Dieser Befund schloß eine Zerstörung des Ringes.

Die Struktur des Uracils ist in 2 tautomeren Formen denkbar (Abb. 3). Nach physikalischen und chemischen Untersuchungen ist die Lactamform die überwiegende, wohingegen das UV-Maximum bei 258 m μ auf ein längeres, konjugiertes System der Lactimform schließen läßt. Uracil ist also praktisch ein Tetrahydropyrimidin-derivat, durch Hydrierung der 5,6-Doppelbindung entsteht Dihydrouracil, eine Verbindung mit 2 isolierten Lactamcarbonylgruppen, welche im Bereich über 200 m μ bei pH 7,0 kein Absorptionsmaximum besitzt.

Aufgrund dessen schlossen SINSHEIMER und HASTINGS ⁵⁸⁾, daß bei der Photolyse das Uracil unter Absättigung der 5,6-Doppelbindung reagiert, und zwar durch Wasseranlagerung. Über die Position der OH-Gruppe konnten die Autoren noch nichts aussagen. Wegen der geringen Stabilität des Produktes gelang eine Isolierung erst 1958 MOORE ⁴⁰⁾. Er konnte durch

Strahlenchemische Veränderungen im
URACIL-MOLEKUL

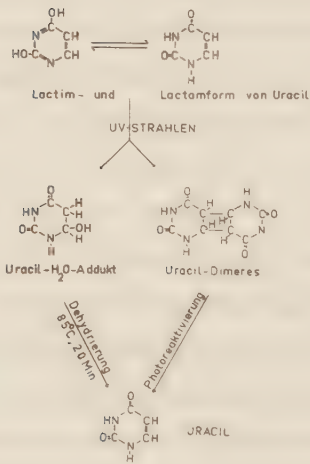


Abb. 3

Chromatographie mit Vergleichssubstanzen die Struktur bestimmen, es handelt sich um ein 6-Hydroxydihydro-Uracil. 1955 gelang ihm ⁴¹⁾ schon die Isolierung und Analyse des Photoproduktes des 1,3-Dimethyluracils; es ist ebenfalls ein 6-Hydroxy-Produkt. Auch Cytidin und Cytidylsäure reagieren bei UV-Bestrahlung vermutlich unter Wasseranlagerung. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei analog der Reaktion Cytidin-Dihydrocytidin von 275 m μ nach 240 m μ ^{58a)}. Dieses Produkt ist noch instabiler als das Uracil-Wasser-Addukt; schon bei Zimmertemperatur wird es in Cytidin zurückverwandelt.

Das Problem schien also im wesentlichen gelöst, nur eines war noch nicht geklärt: Durch Erhitzen von bestrahlten Uracil-Lösungen ließ sich nie der gesamte Extinktionsabfall revertieren. Daraus und aus kinetischen Untersuchungen schlossen RÖRSCH et al ⁵⁰⁾, daß es außer der reversiblen Reaktion noch eine "irreversible" Reaktion geben müsse.

Von allen in den Nukleinsäuren vorkommenden Pyrimidinen hatte sich Thymin als das am meisten strahlenresistente erwiesen. 1958 stellten jedoch BEUKERS, ILSTRA und BERENDS ³⁾ fest, daß bei Bestrahlung einer eingefrorenen wässrigen Thyminlösung jedoch ein hoher Extinktionsabfall eintrat. Es gelang den Autoren dieses Bestrahlungsprodukt, das im Verhältnis zu dem Uracil-Wasser-Addukt sehr stabil ist, zu isolieren ^{7a)}. Aus der Elementaranalyse, dem Molekulargewicht, dem IR-Spektrum, dem Kernresonanzspektrum und aus der Kristallstruktur schlossen sie, daß es sich bei dem Thyminbestrahlungsprodukt um ein Dimeres des Thymins handeln muß, und zwar reagiert Thymin

unter Ausbildung eines Cyclobutanringes an den 5,6 Stellungen. Der endgültige chemische Strukturbeweis durch Abbau steht noch aus, doch das bis jetzt vorliegende Material läßt eine andere Struktur undenkbar erscheinen. Schon bald nach der Entdeckung des Thymin-Dimeren, gelang es SHUGAR und Mitarbeitern 1961, die Struktur des Uracil-Dimeren festzustellen.

WACKER et al ⁶⁹⁾ folgerten nun, angeregt durch die Arbeiten von BERENDS und BEUKERS, daß im DNS-Strang für die Basen ein ähnlicher "eingefrorener Zustand" vorliegen müsse. Bei der UV-Bestrahlung von DNS müßte sich also auch aus zwei benachbarten Thymin-Molekülen ein Dimeres bilden. Es gelang ihnen nun tatsächlich, aus bestrahlten Zellen von Enterococcus Stei, die mit radioaktivem Thymin kultiviert worden waren, ein radioaktives Bestrahlungsprodukt zu isolieren, das mit dem Thymin-Dimeren identisch war. Diese Umwandlung, die schon bei relativ geringen UV-Dosen vor sich geht, kann für die mutagene Wirkung der UV-Strahlen verantwortlich gemacht werden.

Weitere Untersuchungen von WACKER und Mitarbeitern ^{70, 71)} zeigten, daß auch andere Pyrimidinbasen ähnliche Dimere bilden können, wenn sie der UV-Strahlung ausgesetzt werden. Diese Dimeren (von Uracil und Cytosin) sind jedoch nicht so stabil wie das Dimere von Thymin und können vielleicht für die verschiedenen Reaktivierungseffekte nach einer UV-Bestrahlung verantwortlich gemacht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann also mit Sicherheit geschlossen werden, daß die biologische Einwirkung der UV-Bestrahlung auf einer Veränderung der Basenbausteine der Nukleinsäuren beruht. Eine Aufklärung dieser biologischen Schädigung durch UV-Licht auf biochemische Weise konnte bisher nicht gegeben werden, da es keine Technik gab, durch die man die in vitro-Rolle der Nukleinsäuren studieren konnte. Die Entdeckung des genetischen Codes durch die klassischen Versuche von NIRENBERG und MATTHAEI ⁴³⁾ hat einen raschen Weg zu diesem Thema gezeigt. Arbeiten verschiedener Autoren ^{28, 46)} haben bewiesen, daß die Proteinsynthese von einer bestimmten Zusammensetzung der Basen in der Nukleinsäure abhängig ist.

Aus diesen Beobachtungen ist zu vermuten, daß eine in vivo Zerstörung der Proteinsynthese durch eine Veränderung der Basenzusammensetzung der Nukleinsäure verursacht wird. Kürzlich konnte ZUCKERKANDL ⁷⁹⁾ zeigen, daß eine Veränderung der Hämoglobin-Struktur in Thalacämia durch eine Veränderung der Basen besteht. Eine wichtige Aufgabe für die Zukunft der Biochemie besteht darin, eine Beziehung zwischen Nukleinsäurebasen und Proteinsynthese weiter zu untersuchen. Dafür braucht man aber verschiedene Methoden, womit die spezifische Zerstörung oder Veränderung einer Base möglich ist. Wie schon gezeigt wurde, ist unter dem Einfluß von UV-Licht die spezifische Zerstörung oder Veränderung einiger Basen möglich. Im Hinblick auf diese Überlegungen ist eine Lösung des Problems über die Beeinflussung der Proteinsynthese durch UV-Licht ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des genetischen Codes bei der

Proteinsynthese im zellfreien System.

2.2. Aufgabenstellung

In letzter Zeit ist viel über die Beeinflussung der zellfreien Proteinsynthese durch synthetische Polynukleotide bekannt geworden. Man weiß heute, daß der Einbau einer Aminosäure nur durch eine bestimmte Zusammensetzung der Basen in m-RNS möglich ist. Weiterhin ist es bekannt, daß für jede Aminosäure eine spezifische t-RNS existiert. Wie sich die t-RNS für verschiedene Aminosäuren unterscheiden, ist noch nicht bekannt. Ob eine Beziehung zwischen dem Codon in m-RNS und der Basenzusammensetzung der t-RNS besteht, ist auch fraglich.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich Veränderungen in den Codons unter dem Einfluß von UV-Licht bei der Proteinsynthese auswirken. Hier werden solche Codons untersucht, die durch UV-Licht beeinflußt werden können, z. B. Polyuridylsäure (UUU) und Polycytidylsäure (CCC). Weiterhin ist es interessant zu prüfen, ob nach den bisherigen Vermutungen ein komplementärer Code in t-RNS tatsächlich existiert. Die Untersuchung eines solchen Problems ist nur in einem System möglich, in dem der m-RNS Code aus Polyadenylsäure (AAA) besteht. Damit stehen zwei vergleichbare Systeme zur Verfügung, der Einbau von Phenylalanin durch UUU und der Einbau von Lysin durch AAA.

2. 3. Ergebnisse und Diskussion

A. Einwirkung von UV-Licht auf Polyuridylsäure

Im Laufe der Untersuchungen über die Kinetik des Einbaus von Phenylalanin in Gegenwart von Polyuridylsäure (Poly-U) und transfer-RNS (t-RNS) stellte sich heraus, daß die zellfreie Synthese von Polyphenylalanin von der Menge der Poly-U sowie auch der t-RNS abhängig ist. Wie aus Abb. 4 ersichtlich, ist der Einbau von Phenylalanin von der Poly-U-Konzentration ab-

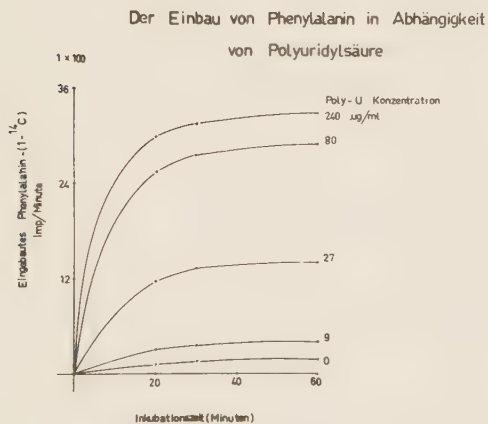


Abb. 4 Das Reaktionsgemisch enthielt (in $\mu\text{mol/ml}$): Tris 100, Magnesiumacetat 10, Kaliumchlorid 50, Mercaptoäthanol 6, Phosphoenolpyruvat 5, Pyruvat-kinase 20 μg , ATP 5, C-14-Phenylalanin 0,02 (4,2 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$), Fraktion S-30 0,1 ml oder Fraktion S-100 0,05 ml und Ribosomen ca 1 mg Protein. Gesamtvolumen 0,25 ml. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C inkubiert und nach 20, 30 und 60 Minuten Einbau gemessen.

hängig. Konzentrationen über 80 $\mu\text{g/ml}$ Poly-U zeigten nur noch eine geringe Stimulierung. Diese Konzentration wurde beim Phenylalanin-Einbau als optimal gefunden. In Abb. 5 sieht man, daß t-RNS eine stimulierende Einwirkung auf den Einbau von Phenylalanin hat. Diese stimulierende Wirkung von t-RNS ist der Poly-U ähnlich, d. h. bei sehr hohen Konzentrationen von t-RNS findet man eine sehr geringe Stimulierung oder sogar eine Hemmung. Diese Versuche mit t-RNS zeigen, daß die optimale Konzentration der t-RNS zwischen 1 und 2 mg/ml liegt.

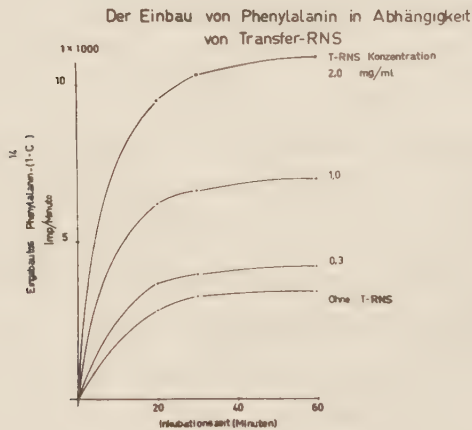


Abb. 5 Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wie unter Abb. 4 angegeben.

Nach diesen Versuchen kann man erwarten, daß eine kleine Zerstörung der Basen in m-RNS oder t-RNS eine Hemmung der Proteinsynthese verursacht. Da es schon bekannt ist, daß Uracil unter dem Einfluß von UV-Licht in zwei Photoprodukte umgewandelt wird - das Wasseranlagerungsprodukt und das Dimere - war es notwendig zu untersuchen, ob solche Photoprodukte in Poly-U die Proteinsynthese beeinflussen können. Aus dieser Sicht wurden Versuche über die photochemische Umwandlung von Uracil in Poly-U mit den verschiedenen UV-Dosen durchgeführt.

Bestrahlt man Poly-U mit UV-Licht, so nimmt die Extinktion bei 260 m μ ab. Die Abnahme der Extinktion bei 260 m μ unter dem Einfluß von verschiedenen UV-Dosen ist in Abb. 6 gezeigt.

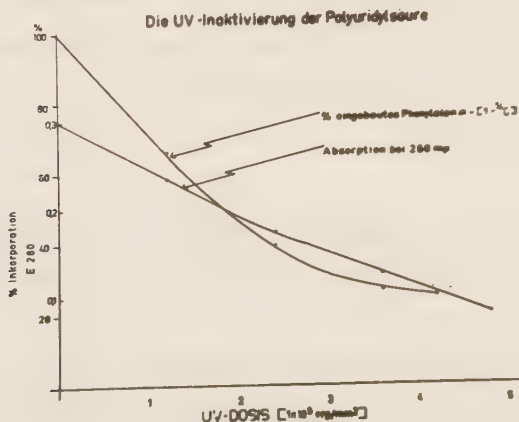


Abb. 6 Die Proben wurden mit einem Quecksilberniederdruckbrenner [253,7 m μ] bestrahlt. Das Reaktionsgemisch enthielt 80 μ g Poly-U/ml.

Wie aus der Kurve ersichtlich ist, werden bei einer UV-Dosis von $2,4 \times 10^5$ erg/mm² etwa 50 % Poly-U verändert. Man bezeichnet eine solche Veränderung als Inaktivierung und deshalb wird diese Terminologie auch hier verwendet. Weiterhin war es von Interesse, die Kinetik des Einbaus von Phenylalanin im Zusammenhang mit der Inaktivierung der Poly-U zu untersuchen. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, findet man eine entsprechende Hemmung des Einbaus von Phenylalanin nach UV-Bestrahlung von Poly-U. Da die Zerstörung von Poly-U etwa mit der Hemmung des Einbaus parallel läuft, bedeutet es, daß die Photoprodukte von Uracil, die durch UV-Strahlen gebildet werden, unfähig sind, als m-RNS beim Phenylalanin-Einbau zu dienen.

Weiterhin wurde untersucht, wie andere U-haltige Heteropolymere durch UV-Strahlen beeinflusst werden. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Einwirkung von UV-Strahlen auf Poly-UC [4 : 1], Poly-UA [6 : 1] und Poly-UAC [6 : 1 : 1] untersucht.

Bestrahlt man die oben genannten Polynukleotide mit UV-Licht, so zeigt sich eine unterschiedliche Abnahme der Extinktion.

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, nimmt die UV-Empfindlichkeit in der Reihenfolge U, UA, UC, UAC ab. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit der Polynukleotide könnte von zwei Faktoren abhängig sein: a) vom Uracilgehalt der Polynukleotide und b) von der Sequenz der Basen in den Polynukleotiden. Eine

Zwischenschaltung der Heterobasen C und A zwischen UU-Sequenzen sollte die Dimeren-Bildung verhindern. Die letztere Möglichkeit wird in dem Heteropolymer UAC sehr deutlich und die Resistenz von UAC gegen UV-Strahlen ist auf eine Verhinderung der Dimere-Bildung zurückzuführen.

Versuche über den Einbau von Phenylalanin durch die oben genannten Heteropolynukleotide zeigten, daß die Hemmung des Einbaus durch UV-Bestrahlung der Polynukleotide mit deren Extinktionsabnahme parallel geht. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, hemmt eine UV-Dosis von $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ bei Poly-U den Einbau zu 95 %, bei Poly-UAC dagegen nur zu 57 %.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die UV-Empfindlichkeit der Heteropolynukleotide nicht nur vom Uracilgehalt abhängig ist, sondern auch von der Natur der Heterobase, z. B. könnte die Anwesenheit von Cytosin genau so empfindlich machen, wie die von Uracil. Aber die Anwesenheit einer der Purinbasen könnte das Polymere gegen UV-Strahlen resistent machen.

B. Reaktivierung UV-bestrahlter Poly-U durch Hitze.

WACKER und Mitarbeiter ⁶⁶⁾ zeigten, daß Uracil bei kleinen UV-Dosen ein dimeres Produkt bevorzugt und bei höheren UV-Dosen vornehmlich das Wasseranlagerungsprodukt bildet. Es galt nun die biologische Bedeutung dieser Photoprodukte bei der Proteinsynthese zu untersuchen. Aufgrund der Beobachtungen von SINSHEIMER und HASTINGS ⁵⁸⁾, daß UV-bestrahltes Uracil durch Dehydratisierung etwa reaktivierbar ist, war es uner-

Tab. 1

UV-Empfindlichkeit der Hetero-Polynukleotide bei der Proteinsynthese

m-RNS	% Einbau von Phenylalanin- [3 ¹⁴ C-]	UV-Dosen [10 ⁻⁵ erg/mm ²]	1,2	2,4
	Normal	0,12		
Poly-U	100 [12240] ⁺		26	5
Poly-UC [4:1]	100 [2685] ⁺	80	51	13
Poly-UA [6:1]	100 [6700] ⁺		42	14
Poly-UA [2,5:1]	100 [1806] ⁺	118	72	48
Poly-UAC [6:1:1]	100 [5100] ⁺		55	43

+ Imp/min/mg ribosomales Protein. Poly-U 80 µg/ml, Poly-UA [6:1] 80 µg/ml, Poly-UC [4:1] 96 µg/ml, Poly-UA [2,5:1] 88 µg/ml und Poly-UAC [6:1:1] 80 µg/ml.

länglich, den Einfluß der Reaktivierung UV-bestrahlter Poly-U auf die Proteinsynthese festzustellen.

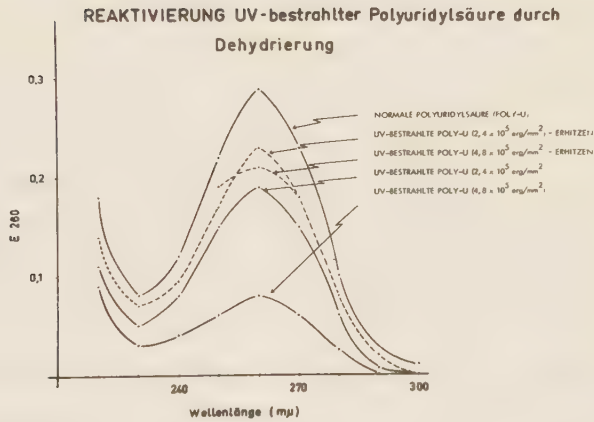


Abb. 8 Die Proben wurden nach der UV-Bestrahlung 15 Minuten lang auf 90°C erhitzt.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, läßt sich durch Erhitzung eine mit $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ bestrahlte Poly-U zu etwa 20 % reaktivieren. Bestrahlt man Poly-U mit einer UV-Dosis von $4,8 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ und erhitzt dann, so findet man etwa 70 % Reaktivierung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Abnahme der Extinktion bei 260 mμ von UV-bestrahlter Poly-U durch Erhitzen reaktivier-

bar ist. Da diese Reaktivierung nach einer höheren UV-Dosis stärker ist, ist bestätigt, daß durch höhere UV-Dosen mehr Wasseranlagerungsprodukt gebildet wird. Wir wollten außerdem untersuchen, ob auch der Einbau von Phenylalanin reaktivierbar ist. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, findet eine Hemmung von etwa 28 % des Einbaus statt, wenn man Poly-U mit einer UV-Dosis von $1,2 \times 10^5$ erg/mm² bestrahlt.

Tab. 2

Wirkung von Hitze auf UV-bestrahlte
Poly-U

UV-Dosis [10^{-5} erg/mm ²]	Hitze	Phe.-[¹⁴ C-] Einbau %
0	-	100
0	+	92
1,2	-	75
2,4	-	35
2,4	+	48

Bestrahlt man Poly-U mit einer höheren Dosis von $2,4 \times 10^{-5}$ erg/mm², so sinkt die Einbaurrate auf 35 % ab. Es war adurch Erhitzen möglich, den Einbau auf etwa 45 % zu verbessern.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß eine teilweise Hitze-Reaktivierung von UV-bestrahlter Poly-U durch Dehydratisierung

möglich ist. Da diese Reaktivierung nach höheren UV-Dosen viel stärker ist, stimmt sie mit den Versuchsergebnissen von WACKER und Mitarbeitern ⁶⁶⁾ über die photochemische Umwandlung des Uracils überein.

C. Photoreaktivierung UV-bestrahlter Poly-U.

Versetzt man durch UV-Bestrahlung inaktivierte Bakterien mit einem zellfreien Hefeextrakt und bestrahlt sie mit sichtbarem Licht, so wird dadurch ein Teil der Bakterien wieder reaktiviert ⁵¹⁾. Man bezeichnet dieses Phänomen als Photoreaktivierung. Arbeiten aus unserem Institut ^{69a)} haben gezeigt, daß bei UV-Dosen, die eine Abtötung von 90 % der Bakterien verursachten, schon die Bildung von Thymin-Dimerem (0,06 %) nachweisbar war. Es ist deshalb hieraus zu schließen, daß die letale Wirkung des UV-Lichtes auf Bakterien überwiegend, wenn nicht ausschließlich, durch die Dimerisierung von in der Bakterien-DNS enthaltenen Thyminmolekülen verursacht wird. Arbeiten anderer Autoren ^{7a, 17, 20)} unterstützten diese Hypothese. Wenn die Ursache der Abtötung der Bakterien eine Thymin-Dimerisierung ist, so könnte die Photoreaktivierung auf einer Spaltung des Dimeren beruhen. Weitere Arbeiten aus diesem Institut ^{66, 73)} bestätigen tatsächlich, daß durch eine Entdimerisierung des Thymins im DNS-Molekül unter dem Einfluß geeigneter Sensibilisatoren die Überlebensrate der UV-bestrahlten Bakterien gesteigert werden kann. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß durch Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat ⁷³⁾ zusammen mit sichtbarem Licht eine Entdimerisierung des Thymins und parallel dazu eine Reaktivierung der

Bakterien stattfand. Aufgrund dieser Beobachtungen war es von Interesse zu untersuchen, ob unter dem Einfluß oben genannter Sensibilisatoren eine Reaktivierung der UV-bestrahlten Poly-U stattfinden kann.

Die Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Normale oder UV-bestrahlte Poly-U wurde mit den entsprechenden Sensibilisatoren versetzt und in einem Wasserbad bei 12°C mit zwei PHILIPS-Tageslichtlampen bestrahlt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in zwei Fraktionen geteilt. Die eine wurde zur Extinktionsmessung bei 260 m μ gebraucht, während die andere als m-RNS zum Einbau von Phenylalanin verwendet wurde.

Bestrahlt man Poly-U mit einer UV-Dosis von $2,4 \times 10^5$ erg/mm², so nimmt die Extinktion bei 260 m μ um etwa 25 % ab. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, läßt sich die Extinktion durch Behandlung mit Wasserstoffperoxyd und sichtbarem Licht zu etwa 80 % des Anfangswertes revertieren. Dies bedeutet, daß auf der UV-Dosis 10 - 15 % inaktivierter Poly-U aus Wasseranlagerungsprodukt besteht, der unter dem Einfluß von Peroxyd und sichtbarem Licht nicht reaktivierbar ist.

Behandelt man eine zu 75 % inaktivierte Poly-U mit Wasserstoffperoxyd und sichtbarem Licht, so findet eine Reaktivierung von nur etwa 8 % statt. Der nicht reaktivierbare Teil kann vermutlich aus dem Wasseranlagerungsprodukt bestehen. Diese Beobachtung, daß bei höheren UV-Dosen mehr Wasseranlagerungsprodukt gebildet wird, stimmt genau mit den Versuchen über die Reakti-

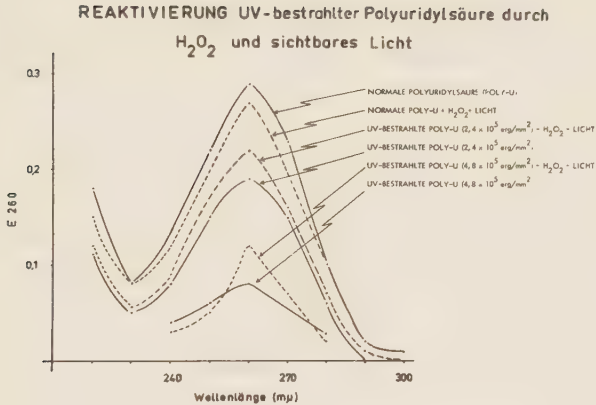


Abb. 9 Poly-U wurde in Gegenwart von $3 \mu\text{g/ml}$ Wasserstoffperoxyd mit $6,6 \times 10^6 \text{ erg/mm}^2$ Licht einer Quecksilberdampf Lampe HPR 125 W der PHILIPS GmbH bestrahlt.

vierung UV-bestrahlter Poly-U durch Dehydratierung überein. Die Behandlung von UV-bestrahlter Poly-U mit Uranylacetat und sichtbarem Licht zeigte einen ähnlichen Anstieg der Extinktion.

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, läuft die Reaktivierung mit Uranylacetat ähnlich wie die mit Wasserstoffperoxyd. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man vermuten, daß der Wirkungsmechanismus für beide Sensibilisatoren der gleiche ist.

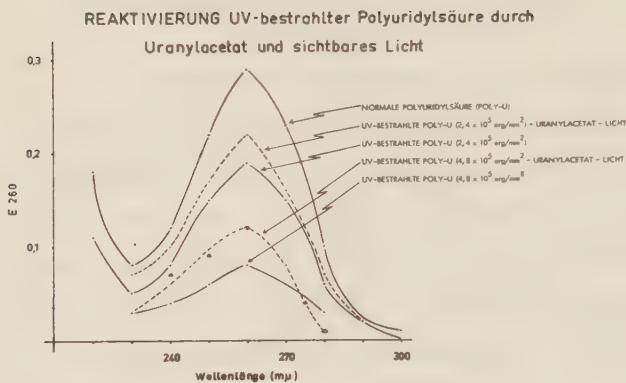


Abb. 10 Polyuridylsäure wurde in Gegenwart von $5 \mu\text{g/ml}$ Uranylacetat mit $6,6 \times 10^6 \text{ erg/mm}^2$ Licht einer Quecksilberdampf Lampe HPR 125 W bestrahlt. Die Polyuridylsäure-Lösung wurde nach der Belichtung dialysiert.

Es war weiterhin von Interesse, zu untersuchen, welchen Einfluß die Photoreaktivierung UV-bestrahlter Poly-U auf die Proteinsynthese hat. Daher wurde die Aktivität, als m-RNS beim Einbau von Phenylalanin zu fungieren, der UV-bestrahlten Poly-U vor und nach Photoreaktivierung gemessen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, hat die UV-Bestrahlung von Poly-U mit $1,2 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ eine Hemmung des Einbaus von Phenylalanin von etwa 25 % zur Folge. Diese Hemmung kann allein durch Behandlung mit Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat aufge-

hoben werden. Zusätzliche Bestrahlung mit sichtbarem Licht verstärkt den Effekt des Wasserstoffperoxyds als auch des Uranylacetats. In beiden Fällen überschreitet man überraschenderweise die Ausgangsaktivität. Auch die Aktivität der nicht bestrahlten Poly-U läßt sich durch Behandlung mit Wasserstoffperoxyd allein oder unter gleichzeitiger Bestrahlung mit sichtbarem Licht um etwa 10 % verbessern. Wird Poly-U mit $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ inaktiviert, so ist sie nicht mehr vollständig reaktivierbar. Der nicht reaktivierbare Teil besteht vermutlich aus dem Wasseranlagerungsprodukt des Uracils. Da die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat vermutlich zur Aufspaltung des Dimeren führt, ist zu erwarten, daß das Wasseranlagerungsprodukt unter diesen Bedingungen nicht dehydratisiert wird. Der molekulare Mechanismus der Dimeren spaltenden Wirkung des Wasserstoffperoxyds und Uranylacetats verläuft vermutlich über die Bildung von Radikalen, wobei Licht die Radikalebildung verstärkt.

D. Reaktivierung UV-bestrahlter Poly-U durch UV-Licht.

BERENDS et al ^{3-7, 50)} und WACKER und Mitarbeiter ⁶⁹⁾ zeigten, daß sich das durch Bestrahlung in Eis gebildete Thymin-Dimere nach dem Auftauen und nach erneuter UV-Bestrahlung teilweise in Thymin zurückverwandelt. Die Kinetik der Photodimerisierung wurde der Wasseranlagerung bei Polyuridylsäure wurde kürzlich von SWENSON und SETLOW ^{61, 62)} mit UV-Licht verschiedener Wellenlängen untersucht. Sie fanden, daß der durch Erhitzen nicht reaktivierbare Teil in UV-bestrahlter Poly-U nach erneuter UV-Bestrahlung bei 238 m μ reaktivierbar ist. Interessant war

Tab. 3

Die Photoreaktivierung UV-inaktivierter Polyuridylsäure.

System	H ₂ O ₂	Uranylacetat	Licht	Phenylalanin Einbau %
Poly-U (unbestrahlt)	-	-	-	100
Poly-U (UV-bestrahlt)	-	-	-	75
1,2 x 10 ⁵ erg/mm ²	+	-	-	104
	+	-	+	109
	-	+	-	86
	-	+	+	107
Poly-U (UV-bestrahlt)	-	-	-	35
2,4 x 10 ⁵ erg/mm ²	+	-	-	76
	+	-	+	87
	-	+	-	73
	-	+	+	90

nun zu sehen, ob die Rückwandlung des UV-gebildeten Dimeren die Proteinsynthese beeinflussen kann. In den folgenden Versuchen wurde die Einwirkung von verschiedenen UV-Dosen der Wellenlänge $240\text{m}\mu$ auf die bei $254\text{m}\mu$ bestrahlte Poly-U untersucht.

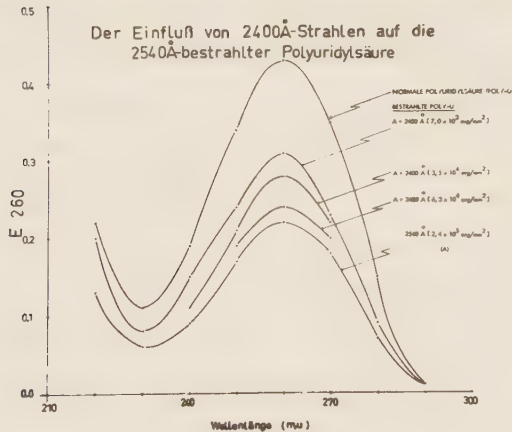


Abb. 11 Die Proben wurden bei verschiedenen Wellenlängen in Quarzküvetten (0,5 cm) in einem Monochromator bestrahlt.

Wie in Abb. 11 gezeigt wird, läßt sich die Extinktion UV-be-strahlter Poly-U nach erneuter UV-Bestrahlung bei $240\text{m}\mu$ re-vertieren. Bestrahlt man Poly-U mit UV-Licht bei $254\text{m}\mu$ ($1,2 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$), so findet eine Abnahme der Extinktion von etwa 35 % statt. Nach erneuter UV-Bestrahlung bei $240\text{m}\mu$

(7×10^3 erg/mm²) steigt die Extinktion um etwa 20 % an. Eine weitere Bestrahlung bei 240 mμ führte wieder zu einer langsamen Abnahme der Extinktion. Die Extinktion einer bei 254 mμ bestrahlter Poly-U ($2,4 \times 10^5$ erg/mm²) steigt nach erneuter Bestrahlung bei 240 mμ (7×10^3 erg/mm²) um etwa 50 % wieder an. (S. Abb. 11) Diese Beobachtungen stimmen mit den vorherigen Ergebnissen überein, wo gezeigt wird, daß bei höherer UV-Dosis Uracil aus einem Wasseranlagerungsprodukt besteht. Ferner wurde geprüft, wie unter den oben genannten Bedingungen der Einbau von Phenylalanin beeinflusst wird (Abb. 12).

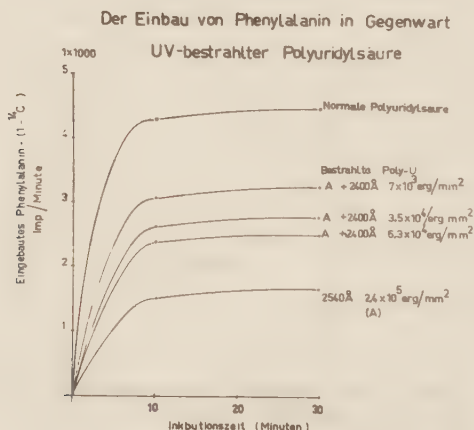


Abb. 12 Die Proben wurden bei verschiedenen Wellenlängen in Quarzküvetten (0,5 cm) in einem Gittermonochromator der Firma BAUSCH & LOMB, Rochester (USA) bestrahlt.

Wie aus Abb. 12 ersichtlich, läuft der Einbau von Phenylalanin parallel zur Extinktionsveränderung der Poly-U. Der Mechanismus dieser Reaktivierung ist auf die Dimeren-Aufspaltung durch erneute UV-Bestrahlung zurückzuführen.

E. Einfluß von UV-Licht auf t-RNS und Ribosomen in der Polyphenylalaninsynthese.

Auf den letzten Seiten wurde gezeigt, wie sich die Polyuridylsäure unter dem Einfluß von UV-Licht verändert und dadurch die Polyphenylalaninsynthese beeinflusst wird. Man nimmt an, daß zu jedem Codon in der m-RNS ein komplementäres Codewort in der t-RNS existiert. Mit anderen Worten kann man sagen, daß die Spezifität der t-RNS für jede Aminosäure in seinem Nukleotid-Code liegt. Das Codewort für die Inkorporation von Phenylalanin lautet in der m-RNS UUU. Von dieser Hypothese ausgehend kann man erwarten, daß nach UV-Bestrahlung der m-RNS die Proteinsynthese beeinflusst wird, dagegen nicht nach Bestrahlung der t-RNS.

Bestrahlt man t-RNS mit verschiedenen UV-Dosen, so findet eine sehr kleine Hemmung des Phenylalanineinbaues statt (Abb. 13).

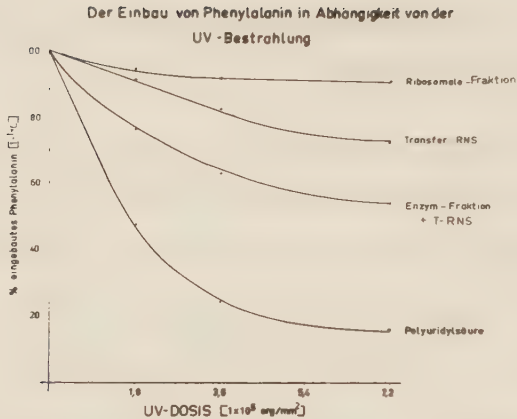


Abb. 13 t-RNS wurde nach ZUBAY ⁷⁸⁾ isoliert und ist eine angereicherte Mischung verschiedener t-RNS. Die UV-Bestrahlung oder t-RNS wurde nach Anlagerung von Phenylalanin unternommen. Gewaschene Ribosomen wurden in Tris-Magnesium pH 7,8 Puffer (ohne Mercaptoäthanol) suspendiert und in Petrischalen mit UV-bestrahlt. Die Proben wurden im Kühlraum bestrahlt. Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wie unter Abb. 4 angegeben.

Im Vergleich zu der Hemmung, die bei der Bestrahlung von m-RNS gefunden wurde, ist diese Hemmung nicht sehr signifikant. Bestrahlung der Ribosomen mit UV-Licht zeigte, daß der Phenylalanin-Einbau nicht beeinflußt wird.

Versuche über den Phenylalanin-Einbau haben gezeigt, daß UV-Bestrahlung der m-RNS den Einbau vollständig verhindern kann, dagegen UV-Bestrahlung der t-RNS einen geringeren Einfluß auf den Einbau hat. Es ist noch zu früh, aus diesen Versuchen auf ein Anticodon in der t-RNS zu schließen. Um diese Frage beantworten zu können, wurde ein Spiegelbild-System, in dem die m-RNS aus dem Codewort AAA und die t-RNS aus dem hypothetischen Code UUU besteht, untersucht.

F. Beeinflussung des Lysin-Einbaues durch UV-Strahlen.

Aus den Arbeiten von NIRENBERG und MATTHAEI ⁴³⁾ ist bekannt, daß das Codewort in der m-RNS für den Lysin-Einbau AAA lautet. Die Abhängigkeit des Lysin-Einbaues von der Polyadenylsäure-Konzentration wird in Abb. 14 gezeigt. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, steigt der Einbau bis zu 120 µg/ml an, bei höheren Konzentrationen findet eine Hemmung statt. Dieser Versuch zeigt, daß die optimale Konzentration der Polyadenylsäure (Poly-A) für den Lysin-Einbau 120 µg/ml ist. Bei allen Versuchen über den Lysin-Einbau wurde diese Konzentration verwendet.

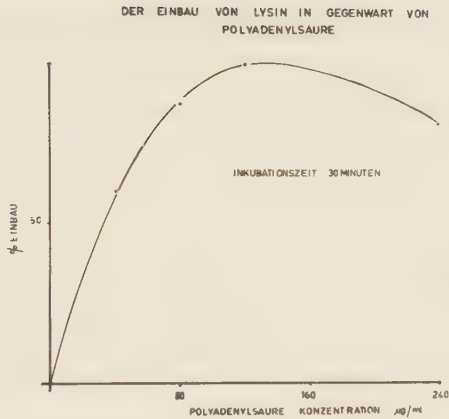


Abb. 14 Reaktionsgemisch wie unter Abb. 4

Die Abhängigkeit des Lysin-Einbaues von der Konzentration an t-RNS ist in Abb. 15 gezeigt. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, liegt die optimale Konzentration der t-RNS zwischen 0,9- und 1,3 mg/ml. In den folgenden Versuchen wurde eine optimale Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

Nachdem die optimalen Bedingungen festgelegt worden waren, wurden die Bestrahlungsversuche durchgeführt, um einen Hinweis für das Anticodon zu haben. Nach den bisherigen Vermutungen soll UUU der komplementäre Code für messenger-RNS-Code AAA sein. Man kann also erwarten, daß nach UV-Bestrahlung der t-RNS der Lysin-Einbau beeinflußt wird, dagegen nicht nach Bestrahlung der m-RNS.

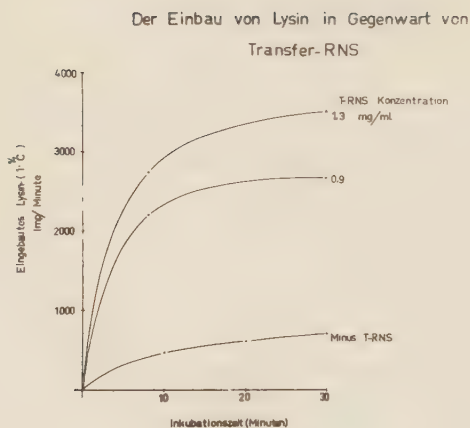


Abb. 15

Bestrahlt man Poly-A mit UV-Licht, so zeigt sich, daß der Lysin-Einbau unverändert bleibt. Wie aus Tab. 16 ersichtlich, hemmt eine UV-Dosis von $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ den Einbau von Lysin um nur 5 %, wogegen der Einbau von Phenylalanin nach Bestrahlung von Poly-U mit der gleichen Dosis zu über 65 % gehemmt wird (siehe Abb. 6).

Besonders hervorzuheben ist die Einwirkung von UV-Licht auf die t-RNS und die t-RNS enthaltende Enzym-Fraktion. Wie Tab. 16 zeigt, hat die Bestrahlung der t-RNS mit $2,4 \times 10^5 \text{ erg/}$

mm^2 eine Hemmung des Lysin-Einbaues von 22 % zur Folge. Die Hemmung des Lysin-Einbaues durch UV-Bestrahlung der t-RNS enthaltenden Enzym-Fraktion ist viel stärker, so daß es möglich ist, daß durch diese Dosis auch Enzyme inaktiviert werden. Es läßt sich zeigen, daß eine UV-Bestrahlung der t-RNS mit $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$, die beim Phenylalanin-Einbau eine Hemmung von 11 % bewirkt, den Lysin-Einbau um 22 % hemmt.

Diese unterschiedliche Hemmung zwischen Phenylalanin- und Lysin-Einbau läßt sich auf die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Basen Uracil und Adenin zurückführen, und gibt, obwohl nicht sehr groß, immerhin einen Hinweis auf einen Anticodon in der t-RNS.

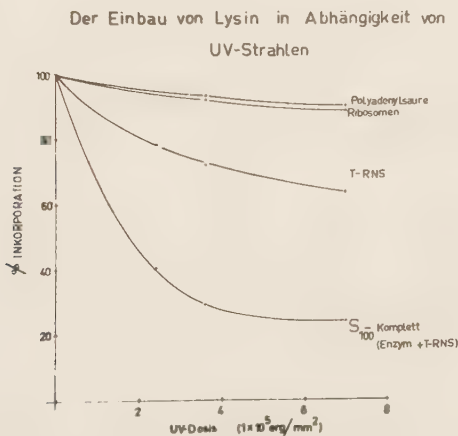


Abb. 16

G. UV-Empfindlichkeit der Polycytidylsäure.

Die Möglichkeit einer Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch die Einwirkung von UV-Licht wurde zuerst von WACKER ^{66a)} erwähnt. Durch papierchromatographische Untersuchungen der UV-bestrahlten radioaktiven DNS konnten DELLWEG und WACKER ^{15a)} zeigen, daß mit einer Dosis von $38,7 \times 10^4 \text{ erg/mm}^2$ etwa 6 bis 7 % des Cytosins in Uracil und Uracil-Dimeres verwandelt wurden. Man erwartet also, daß unter dem Einfluß von UV-Licht die Spezifität der Poly-C als m-RNS für Prolin-Einbau verändert wurde. In Bezug auf diese Ergebnisse wurde die Einwirkung von UV-Licht auf Poly-C untersucht.

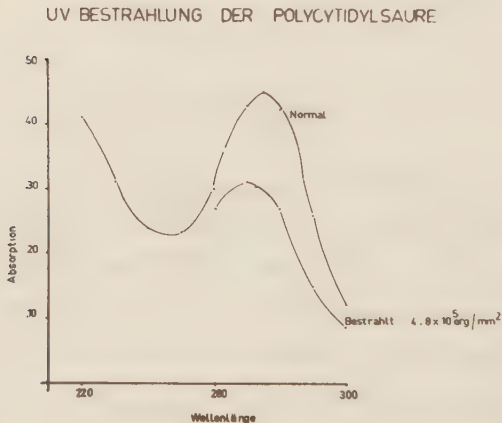


Abb. 17 Die Proben wurden mit einem Quecksilberniederdruckbrenner (Strahlungsmaximum 253,7 m μ) im Kühlraum bestrahlt. Poly-C-Konzentration 2 mg/ml.

Wie aus Abb. 17 hervorgeht, bewirkt UV-Bestrahlung eine Abnahme der Extinktion von Poly-C. Bestrahlt man Poly-C mit UV-Licht ($4,8 \times 10^5$ erg/mm², so zeigt sich papierchromatographisch nach der Hydrolyse, daß etwa 5 % des Cytosins in Uracil umgewandelt wird. Anhand dieser Versuche wurde die Einwirkung von UV-Licht auf Poly-C bei der Proteinsynthese untersucht. Hierzu wurde der Einbau verschiedener Aminosäuren, wie Prolin (CCC), Serin (CCU), Leucin (CUU) und Phenylalanin (UUU) untersucht.

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, hemmt die UV-Bestrahlung ($2,4 \times 10^5$ erg/mm²) den Einbau von Prolin, dagegen zeigt der Einbau von Serin einen Anstieg. Da das Codewort für Serin

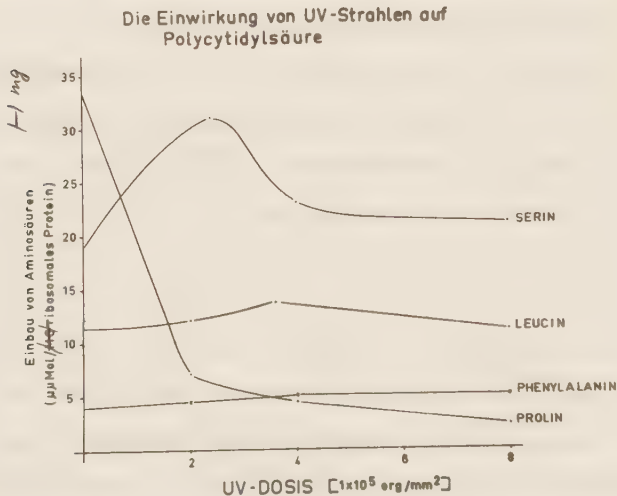


Abb. 18 Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist genau so, wie unter Abb. 4 angegeben. Inkubationsdauer 20 Minuten bei 37°C. Poly-C-Konzentration 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Durch Elektrophorese der UV-bestrahlten Poly-C ($4,8 \times 10^5$ erg/mm²) nach alkalischer Hydrolyse ließen sich 6 % UMP nachweisen.

in der m-RNS CCU lautet, ist anzunehmen, daß bei dieser UV-Dosis eine kleine Menge Cytosin in Uracil umgewandelt wird. Bei weiterer Bestrahlung von Poly-C mit UV-Licht ($4,8 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$) zeigte der Einbau von Leucin einen kleinen Anstieg. Auf den Einbau von Phenylalanin ließ sich auch durch höhere UV-Dosen kein nennenswerter Effekt ausüben. Daraus kann geschlossen werden, daß das Uracil bei höheren UV-Dosen inaktiviert wird.

3. Die Photodynamische Beeinflussung der Proteinsynthese.

3.1. Überblick und Aufgabenstellung

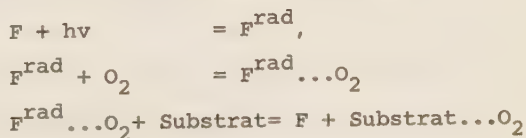
Die Feststellung, daß sichtbares Licht bei der toxischen Wirkung von Farbstoffen auf Mikroorganismen und Tiere eine Rolle spielt, geht über 65 Jahre zurück auf die bahnbrechenden Arbeiten von RAAB⁴⁹⁾. RAAB entdeckte im Jahre 1898, daß die toxische Einwirkung von Acridin auf Paramecia der Intensität des sichtbaren Lichtes proportional ist. Er nannte dieses Phänomen "photodynamischen Effekt".

Unter dem photodynamischen Effekt versteht man im allgemeinen die Schädigung von lebenden Zellen und Geweben bei der Belichtung in Gegenwart von Farbstoffen. Dem Farbstoff kommt bei diesen Reaktionen gleichsam die Wirkung eines Katalysators zu, der die Lichtenergie durch Absorption aufnimmt und, ohne selbst eine Veränderung zu erleiden, auf das gegen sichtbares Licht unempfindliche Zellsystem überträgt und so dessen Zerstörung

einleitet.

Als charakteristische Eigenart des photodynamischen Effektes muß die Tatsache angesehen werden, daß für dessen Zustandekommen molekularer Sauerstoff erforderlich ist^{9, 29, 63, 77}). Bei einer Reihe photodynamischer Reaktionen gelang es auch, die Aufnahme von Sauerstoff durch das geschädigte System selbst festzustellen^{55, 59}). Nach Schenk⁵⁵) ist der photodynamische Effekt als photosensibilisierte Reaktion aufzufassen, bei der das angeregte Sensibilisator-Molekül (Sens^{rad}) über ein Sauerstoff-Anlagerungsprodukt ($\text{Sens}^{\text{rad}} \dots \text{O}_2$) Sauerstoff auf ein Substrat A überträgt.

Die nach diesem Mechanismus ablaufende photodynamische Reaktion setzt weder eine Bildung beständiger Farbstoffperoxyde noch die energetisch unwahrscheinliche O_2 -Anregung voraus; denn die aus dem angeregten Farbstoffmolekül, dem sogenannten phototropisomeren Diradikal (F^{rad}), mit molekularem Sauerstoff entstandene lockere Anlagerungsverbindung ($\text{F}^{\text{rad}} \dots \text{O}_2$) weist eine große Tendenz zur Abgabe des O_2 an einen Akzeptor auf. Für das Reaktionsschema gilt somit in Analogie zur Photosensibilisation:



Da der Farbstoff durch diese Reaktion nicht verändert wird, kann er einen derartigen photodynamischen Zyklus oftmals durchlaufen.

Er wirkt deshalb nach dem Eindringen in eine von ihm zerstörte Zelle auch noch im inneren weiter zersetzend.

Der photodynamische Effekt bewirkt auch eine Schädigung von zellfreien biologischen Systemen, die vor allem auf das Vorhandensein einer angreifbaren Substratkomponente zurückgeht. Beispielweise beobachtete bereits Herzberg ²⁵⁾ den inaktivierenden Einfluß des Lichtes auf Viren in Anwesenheit von Thiopyronin, Pyronin und anderen Farbstoffen. Auch bestimmte giftige Toxine, die von pathogenen Organismen stammen und in ihrer chemischen Konstitution nach Proteine sind, lassen sich so photodynamisch zerstören. Beispielweise beobachtet man dies beim Diphtherietoxin ³⁴⁾.

Im letzten Jahren erschienen zahlreiche Arbeiten über verschiedene Aspekte der photodynamischen Abtötung von Bakterien ⁷²⁾. Markiert man die Purine und Pyrimidine der DNS und RNS, so stellt man bei Bestrahlung der Bakterien, in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer und der Farbstoffkonzentration, nach Perchlorsäurespaltung der gesamten Bakterien eine Zerstörung der Guanin-Molekül fest ⁷²⁾. Bei höheren Dosen sichtbaren Lichtes wird auch Thymin und Cytosin zerstört. Adenin und Uracil werden unter diesen Bedingungen nicht angegriffen. Um 20% des Guanins in *E. coli* 15T⁻ zu zerstören, benötigt man mit Thiopyronin (10 µg/ ml) $0,3 \times 10^7$ erg/ mm², mit Pyronin (10 µg/ ml) $5,2 \times 10^7$ erg/ mm², und mit Methylenblau (10 µg/ ml) $2,8 \times 10^7$ erg/ mm². Zusammenfassend ergibt sich heraus, daß die strahlenchemische Zerstörung des Guanins durch die Farbstoffe mit ihrer photodynamischen Wirkung etwa parallel geht.

Arbeiten von WACKER und Mitarbb. ⁷²⁾ haben gezeigt, daß bei einer Bestrahlung von hochgereinigter DNS und RNS bei Ggw. von Thiopyronin das Guanin der DNS zu etwa 30% photodynamisch zerstört wird, dagegen ist in der RNS eine Zerstörung des Guanins nicht nachweisbar. Bestrahlt man aber eine Lösung von mit ^{14}C -markiertem Guanin mit Thiopyronin ⁶⁶⁾, so findet man papierchromatographisch in n-Butanol-Wasser (86:14) eine Reihe von Photoprodukten, wie in Abb. 19 zu sehen ist.

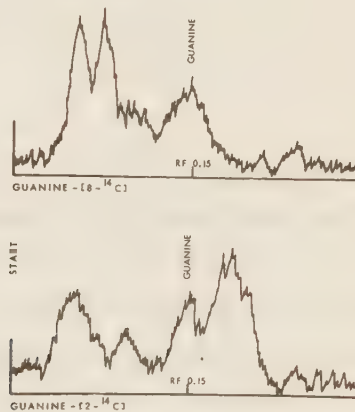


Abb. 19 Bestrahlungsprodukte aus Guanin⁶⁶⁾.

Es war daher von Interesse, die photodynamische Wirkung von Thiopyronin bei der Proteinsynthese zu untersuchen. Hierzu wurden die verschiedenen Reaktionskomponenten mit Thiopyronin photodynamisch behandelt und bei der in vitro Proteinsynthese verwendet.

Überraschenderweise wurde in den letzten Jahren bekannt, daß die photodynamische Wirkung der Furocumarine unabhängig von Sauerstoff ist. Aus Versuchen von OGINSKY und Mitarbb.⁴⁷⁾ geht hervor, daß die photodynamische Inaktivierung der Bakterien durch Psoralen, ein Cumarinderivat, von Sauerstoff unabhängig ist und auch bei niedriger Temperatur beobachtet werden kann.

Verändert man die molekulare Struktur des Psoralens(s.Abb. 20), führt man z.B. in 8-Stellung eine Methoxy-Gruppe als Substituent ein (Xanthotoxin), so wird die photodynamische Wirkung um 50% herabgesetzt.

Da diese Substanzen auch ohne Sauerstoff photodynamisch wirksam sind, ist anzunehmen, daß die Wirkungsweise dieser Substanzen von der des Thiopyronins oder Methylenblau verschieden ist. Worauf die für Bakterien tödliche Wirkung von Psoralen oder Xanthotoxin zurückzuführen ist, ist noch nicht bekannt. Bekannt ist aber, daß weder Psoralen noch Xanthotoxin eine Wirkung auf die Nukleinsäurebasen haben ⁷⁴⁾.

Es wurden daher Versuchen unternommen, um die photodynamische Wirkung von Psoralen und Xanthotoxin auf die Proteinsynthese zu untersuchen.

3.2. Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abb. 20 hervorgeht, läuft die Überlebensrate von E.coli T⁻ nach der Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart von Thiopyronin und Psoralen etwa parallel. Bestrahlt man Bakterien

mit sichtbarem Licht in Gegenwart von Xanthotoxin, so zeigt sich, daß im Vergleich zu Thiopyronin und Psoralen die Abtötungswirksamkeit nur 50% ist ⁷⁴⁾.

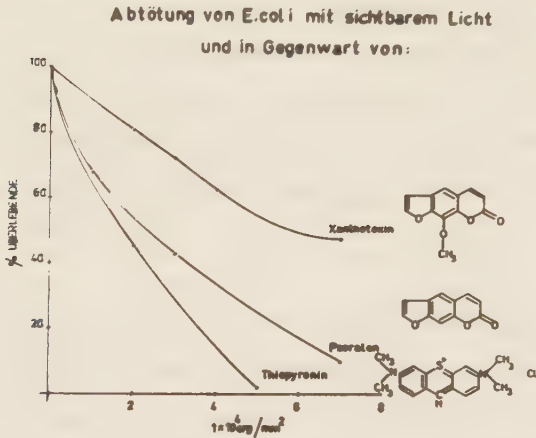


Abb. 20 s. WACKER u. TÜRCK ⁷⁴⁾.

Um den Einfluß von Psoralen und Xanthotoxin auf die zellfreie Proteinsynthese zu untersuchen, wurden die verschiedenen Komponenten des Proteinbiosynthetischen Systems mit sichtbarem Licht in Gegenwart von der beiden Furocumarine bestrahlt und bei der zellfreien Proteinsynthese verwendet. Als Beispiel wurde die Biosynthese von Polyphenylalanin mit Hilfe von Poly-U als m-RNS untersucht.

Bestrahlt man m-RNS (UUU) mit sichtbarem Licht ($6,6 \times 10^6$ erg/mm²)

in Gegenwart von Psoralen oder Xanthotoxin, so zeigt sich, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, daß der Einbau von Phenylalanin unverändert bleibt. Die Behandlung der t-RNS mit Psoralen oder Xanthotoxin und sichtbarem Licht hat auch keine signifikante Wirkung. Eindeutig ist jedoch die photodynamische Wirkung von Psoralen und Xanthotoxin auf die Ribosomen. Wie zu erwarten war, zeigt Psoralen eine deutliche Hemmung des Einbaus, während Xanthotoxin kaum eine Wirkung hat. Die Frage, ob diese Hemmung des Einbaus von Phenylalanin möglicherweise durch eine morphologische Veränderung der Ribosomen verursacht wird, ist noch nicht klar.

Im Zusammenhang mit der oben erwähnten Guanin-Zerstörung (s.S.47) durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht bei Ggw. von Thiopyronin wurde der Einbau von Phenylalanin, Leucin und Serin durch die Codons UUU, UUC und UUC untersucht. Da die dazu gehörenden komplementären Codewörter der t-RNS AAA, AAG, AAG lauten, war ein Einfluß auf den Einbau von Leucin und Serin zu erwarten.

Wie aus Tabelle 5 (s.S. 52) hervorgeht, hat die Bestrahlung der m-RNS in Gegenwart von Thiopyronin keine signifikante Wirkung auf den Einbau der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Serin. Bestrahlt man t-RNS in Gegenwart von Thiopyronin und verwendet sie dann bei der Proteinsynthese, so zeigt sich, daß der Einbau von Phenylalanin unverändert bleibt, wogegen der Einbau von Leucin zu etwa 20% gehemmt wird. Unerwarteteweise, zeigt Thiopyronin keine Wirkung auf den Einbau von Serin.

Tab. 4

Photodynamische Wirkung von Psoralen und Xanthotoxin bei der Proteinsynthese.

System	Psoralen	Xanthotoxin	Licht ⁺⁺	% Einbau
Komplett	-	-	-	100 [6600] ⁺⁺⁺
Komplett-m-RNS	-	-	-	4
m-RNS	+	-	+	105
UUU	-	+	+	102
t-RNS	+	-	+	95
AAA ?	-	+	+	101
Ribosomen	+	-	+	69
	-	+	+	98

⁺⁺) Sichtbares Licht $6,6 \times 10^6$ erg/mm². Psoralen 5 µg/ml und Xanthotoxin 10 µg/ml.

⁺⁺⁺) Imp/min. mg ribosomales Protein.

Tab. 5

Photodynamische Wirkung von Thiopyronin bei der Proteinsynthese.

System	Phenylalanin UUU	Leucin UUC	Serin UUC	% Einbau
Komplett	100 (6600) ⁺	100 (1050) ⁺	100 (5290) ⁺	
Komplett minus m-RNS	4	45	12	
Behandeltes System (Thiopyronin + Licht)				
m-RNS	110	96	102	
t-RNS	94	78	96	
Ribosomen	34	-	-	

⁺ Imp/min mg ribosomales Protein. Poly-U 80 µg/ml, Poly-UC (6,3 : 1) 160 µg/ml. Sichtbares Licht 6,6 x 10⁶ erg/mm². Thiopyronin Konzentration: 10 µg/ml.

Aus diesen Versuchen ist eine eindeutige Bestätigung, daß die hemmende Wirkung von Thiopyronin auf den Leucin-Einbau (t-RNS) durch die Guanin-Zerstörung hervorgerufen wird, nicht zu entnehmen. Um diese Frage zu erklären, wurden Versuche mit Guanin-haltiger m-RNS unternommen. AAG (5 : 1) wurde nach dem Schema von OCHOA mit Hilfe des Enzyms aus Micrococcus Lysodeiktikus polymerisiert. Aus den Versuchen von NIRENBERG und MATTHAEI ist bekannt, daß AAG als m-RNS für Glutaminsäure dient. Verwendet man AAG als m-RNS für Lysin, so bildet sich ein Polypeptid bestehend aus Lysin und Glutaminsäure. Hier ist es zu erwarten, daß eine Zerstörung des Guanins in AAG den Einbau von Glutaminsäure in die Kette Lysin-Glutaminsäure hemmen kann. Die dadurch gebildeten Lysin-Oligopeptide werden mit Trichloressigsäure und Wolframsäure nicht Praecipitiert und man erhält eine Hemmung der Poly-Lysin-Glutaminsäure-Synthese.

Wie aus Tab. 6 ersichtlich, hat die Bestrahlung von Poly-A in Gegenwart von Thiopyronin keine Wirkung auf den Lysin-Einbau. Die Bestrahlung der Poly-AG in Gegenwart von Thiopyronin zeigt dagegen eine Hemmung von ca. 40 %.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die hemmende Einwirkung von Thiopyronin auf die zellfreie Proteinsynthese tatsächlich auf die photodynamische Zerstörung des Guanins zurückzuführen ist.

Tab. 6

Photodynamische Empfindlichkeit von Poly-AG.

System	Licht	Thiopyronin	Lysin-Einbau (%)
Poly-A	+	-	100
	+	+	100
Poly-AG	+	-	100
	+	+	56
minus m-RNS	-	-	20

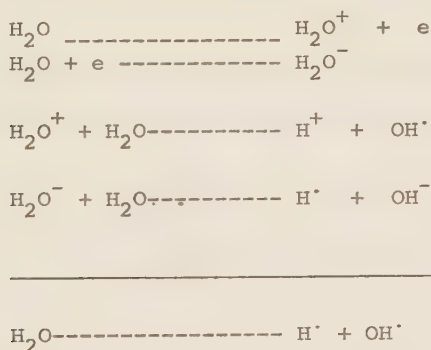
Poly-A 120 $\mu\text{g/ml}$, Poly-AG (5 : 1) 38 $\mu\text{g/ml}$. Sichtbares Licht $6,6 \times 10^6 \text{ erg/mm}^2$, Thiopyronin-Konzentration: 10 $\mu\text{g/ml}$.

4. Die Einwirkung von Röntgenstrahlen auf die Proteinsynthese.

4.1. Überblick und Aufgabenstellung

Im Gegensatz zur UV-Strahlung, die selektiv nur von bestimmten Substanzen absorbiert wird und nur dort chemische Reaktionen auslöst, reagiert Röntgenstrahlung unspezifisch statistisch mit allen Molekülen nach dem Mechanismus des Photoeffektes, d. h. unter Eliminierung von Elektronen aus dem entsprechenden Molekül. In lebenden Zellen ist der überwiegende Teil der

Moleküle Wassermoleküle, ebenso auch in wässrigen Lösungen. Primär reagieren die Röntgenstrahlen in diesen Systemen mit den Wassermolekülen unter Ionisation und Radikalbildung, etwa nach folgendem Schema ³³⁾:



Enthält die wässrige Lösung Sauerstoff, können folgende Reaktionen stattfinden ¹⁾:



Es bildet sich unter diesen Bedingungen Wasserstoffperoxyd, Röntgenstrahlen wirken also oxydierend.

Diese durch die Strahlung gebildeten Radikale haben eine gewisse Lebensdauer, die ausreicht, sie teilweise vor ihrer

Rekombination mit den benachbarten Molekülen reagieren zu lassen. Die chemische Wirkung der Röntgenstrahlen ist also eine Sekundärreaktion. Verschiedene organische Moleküle reagieren unterschiedlich schnell mit den Radikalen; die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit sind aber relativ gering. Bei biologisch wichtigen Zellkomponenten sind sie höchstens um den Faktor 100 verschieden ¹⁾. Am schnellsten reagieren leicht oxydierbare Substanzen, z. B. solche mit freien SH-Gruppen.

Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Nukleinsäure und Nukleinsäurekomponenten ist schon lange das Untersuchungsobjekt vieler Arbeitsgruppen. Es seien hier SCHOLES ⁵⁶⁾ und WEISS und BUTLER ¹²⁾ et al. erwähnt. Von LOCHMANN ³⁵⁾ wurden erstmals radioaktiv markiert Nukleinsäurebasen röntgen bestrahlt.

Thymin reagiert bei Röntgenbestrahlung in wässriger Lösung unter Abnahme der Extinktion bei 264 m μ . Dieser Extinktionsabfall ist den stattfindenden Reaktionen direkt proportional ⁵⁶⁾. Unter Luft reagiert Thymin in 10⁻⁴ m Lösung (pH = 5,6) mit einem G-Wert von 1,1. SCHOLES et al. fanden für ein 2. 10⁻⁴ m Lösung (pH 5,3) unter 1 Atm. Sauerstoff einen G-Wert von 1,89 ⁵⁶⁾.

Cytosin und Uracil reagieren bei Röntgenbestrahlung etwa mit den gleichen G-Wert wie Thymin. Als mögliche Reaktionen sind für das Cytosin ¹⁸⁾ wie auch für das Uracil ⁵⁶⁾ die Bildung von Isobarbitursäure beschrieben, für letzteres ist auch eine Glykolbildung bekannt ⁵⁶⁾. Bei Bestrahlung von Cytosin-[2-¹⁴C-] und anschließender papierchromatographischer Trennung im Lö-

sungsmittelsystem n-Butanol: Wasser (86 : 14) zeigt sich jedoch, daß die Anzahl der Bestrahlungsprodukte wesentlich höher ist, höher auch als bei Thymin³⁵⁾. Die Purinbasen, besonders Adenin, sind wesentlich resistenter gegen Röntgenstrahlen.

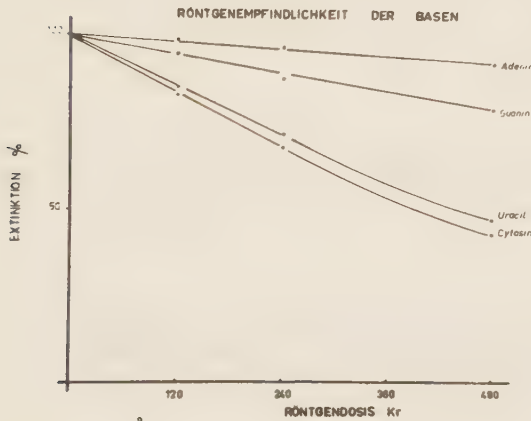


Abb. 21 Röntgenröhre RT 100 (C. H. F. Müller, Hamburg), 100 kV, 8 mA, Dosisleistung 30 Kr/Minute, ungefiltert. Basenkonzentration 50 µg/ml, pH 5,6.

Wie aus Abb. 21 zu ersehen ist, zerstört eine Röntgendosis von 480 Kr mehr als 50 % der Pyrimidinbasen, dagegen Adenin nur zu 6 % und Guanin etwa zu 20 %.

Um diese unterschiedlich Empfindlichkeit der Purine und Pyri-

midine auch anhand der Proteinsynthese in vitro zu zeigen, wurden verschiedene Polynukleotide (Poly-U, Poly-A und Poly-C) Röntgen-bestrahlt und als m-RNS bei der Proteinsynthese eingesetzt.

4.2. Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abb. 22 hervorgeht, verursacht eine Röntgendosis von 480 Kr eine Extinktionsabnahme von 59 % bei Poly-U, 54 % bei Poly-UC (4 : 1), 45 % bei Poly-UA (6 : 1) und 47 % bei Poly-UAC (6 : 1 : 1).

Diese unterschiedlich Empfindlichkeit der Polynukleotide ist offensichtlich vom Uracil- oder Cytosin-Gehalt abhängig.

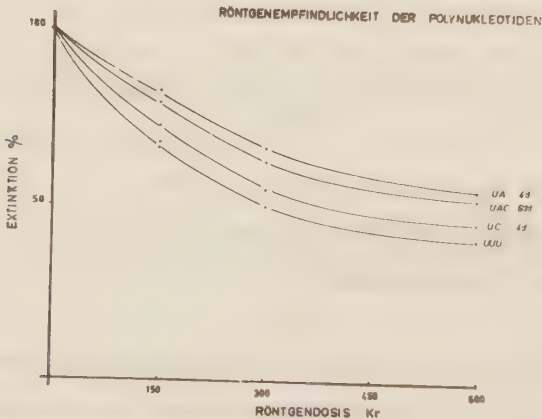


Abb. 22 Poly-UA (6:1) und Poly-UAC (6:1:1) wurden von der Fa. MILES CHEMICAL CO., Elkhart/Indiana (USA) gekauft. Poly-UC (4:1) wurde aus den Nukleosid-di-Phosphaten nach OCHOA hergestellt. Konzentration der Polynukleotide 100 µg/ml, pH 5,6.

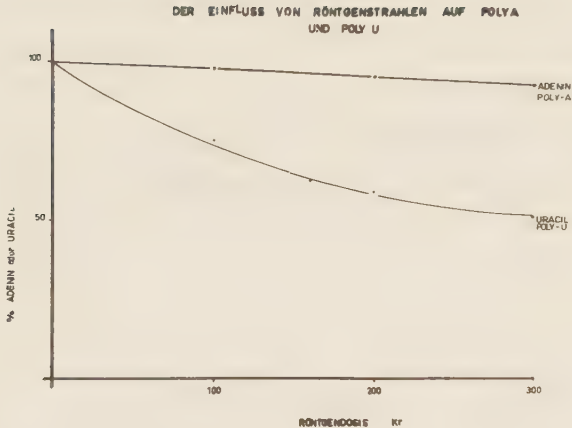


Abb. 23 Basengehalt der Polynukleotide nach Röntgenbestrahlung. Polynukleotidkonzentration: 1 mg/ml, pH 5,6. Dosisleistung der Röntgenröhre 30 Kr/Minute, ungefiltert. Papierchromatographie in Hydrolyse mit heißer Perchlorsäure, n-Butanol:Wasser (86:14).

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, zerstört eine Röntgendosis von 160 Kr 32 % des Uracil-Gehaltes der Polyuridylsäure. Da das Codon für Phenylalanin UUU lautet, untersuchten wir nun, wie sich die Strahlenempfindlichkeit des Codons bei der Proteinsynthese auswirkt. Hierzu wurde Poly-U mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt und als m-RNS beim Phenylalanin-Einbau verwendet.

Wie Abb. 24 (s. S. 60) zeigt, hemmt Röntgenbestrahlung von

Poly-U den Einbau von Phenylalanin. Vergleicht man die chemische Zerstörung des Uracils (Abb. 23) mit dem Phenylalanin-Einbau, so findet man zwischen beiden eine Parallelität.

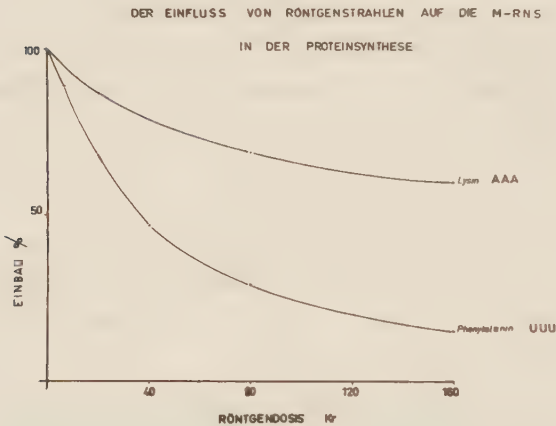


Abb. 24

Da das Anticodon zu dem Codon UUU der m-RNS vermutlich AAA lautet, ist es zu erwarten, daß die Röntgenbestrahlung der t-RNS den Einbau von Phenylalanin nicht so erheblich beeinflusst. hierzu wurden Versuche durchgeführt, wobei t-RNS zuerst Röntgen-bestrahlt und dann im Einbausystem verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigten unerwarteterweise eine Hemmung des

Phenylalanin-Einbaues. Wie aus der Abb. 25 zu sehen ist, hemmt eine Dosis von 160 Kr ein Einbau von Phenylalanin zu etwa 17 %. Diese Hemmung hat ihren Ursprung wahrscheinlich in einer Verkleinerung des t-RNS-Moleküls durch Zerschneiden der Ribophosphat-Kette bei der Röntgenbestrahlung. Die Möglichkeit, daß diese Hemmung durch die Zerstörung von Adenin hervorgerufen wird, ist auszuschließen, da eine Röntgenbestrahlung mit 160 Kr nur 2 - 3 % Verlust des Adenins verursachte (s. Abb. 21, S. 57).

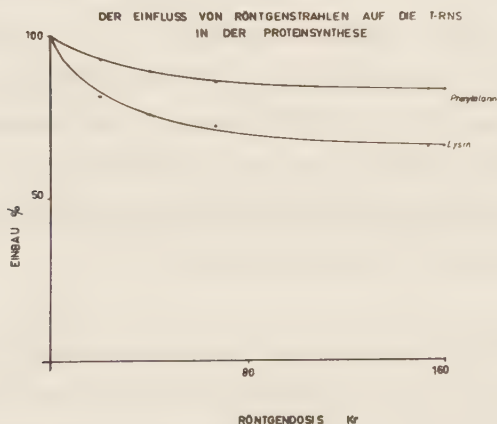


Abb. 25 Bestrahlung der t-RNS nach Anlagerung von Phenylalanin oder Lysin. Röntgenröhre RT 100 C. H. F. MÜLLER, Hamburg, 100 kV, 8 mA Dosisleistung 30 kr/min., ungefiltert.

Der große Unterschied der Strahlenempfindlichkeit zwischen Adenin und Uracil, der aus den Phenylalanin-Einbau-Versuchen deutlich zu ersehen ist, bietet eine ausgezeichnete Möglichkeit, einen Hinweis auf das Anticodon bei der Proteinsynthese zu erhalten. Aus den Ergebnissen kann man schließen, daß die Röntgenbestrahlung des m-RNS-Codons UUU den Einbau von Phenylalanin vollständig verhindern kann, wogegen die Röntgenbestrahlung der t-RNS in diesem Fall nur eine kleine Hemmung zeigt.

Eine Bestätigung dieser unterschiedlichen Empfindlichkeit zwischen Adenin und Uracil kann man auch durch die Einbau-Versuche mit Lysin erhalten. Das Codon der Poly-Lysin-Synthese (AAA) ist ein "Spiegelbild" des Codons Polyphenylalanin-Synthese. Das Anticodon hierzu lautet UUU. Bei Bestrahlung von t-RNS mit Röntgenstrahlen erwartet man somit eine Störung des Lysin-Einbaues, dagegen ist nur ein kleiner Effekt bei Röntgenbestrahlung der m-RNS zu erwarten.

Wie aus Abb. 23 (s. S. 59) hervorgeht, zerstört eine Röntgendosis von 160 kr etwa 3 % des Adenin-Gehaltes der Polyadenylsäure. Abb. 24 (S. 60) zeigt, daß auch bei hoher Röntgendosis nur eine geringe Hemmung des Lysin-Einbaues zu beobachten ist, die von der Hemmung des Phenylalanin-Einbaues durch Röntgenbestrahlung der t-RNS nicht sehr verschieden ist. Es ist daher anzunehmen, daß die geringe Hemmung des Lysin-Einbaues durch Kettenbruch der m-RNS verursacht wird.

Bestrahlt man t-RNS mit verschiedenen Röntgendosen, so findet, wie erwartet, eine stärkere Hemmung des Lysin-Einbaues statt. Wie Abb. 25 (S. 61) zeigt, verursacht eine Röntgendosis von 160 kr eine Hemmung von etwa 30 %, eine Hemmung, die stärker ist als die des Phenylalanin-Einbaues durch Röntgenbestrahlung der t-RNS. Diese unterschiedliche Hemmung des Phenylalanin- und Lysineinbaues durch Röntgenbestrahlung der t-RNS, erlaubt einen Rückschluß auf die Anticodons in der t-RNS, da derartige Unterschiede nur durch die spezifische Zerstörung der Basen, nicht aber durch die Sekundärwirkung der Röntgenstrahlen hervorgerufen werden können.

Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Polycytidylsäure.

Bestrahlt man Polycytidylsäure (Poly-C) mit Röntgenstrahlen und mißt den Cytosin-Gehalt nach der Hydrolyse mit heißer Perchlorsäure, so zeigt sich, daß Cytosin zerstört wird (vgl. auch Abb. 21, S. 57).

Da schon bekannt ist, daß der Codon für den Prolin-Einbau in der m-RNS CCC lautet, war von Interesse, die Auswirkung der Strahlenempfindlichkeit des Codons bei der Proteinsynthese zu untersuchen. Poly-C wurde daher mit verschiedenen Röntgendosen bestrahlt und als m-RNS beim Prolin-Einbau verwendet.

Wie Abb. 26 zeigt, hemmt die Röntgenstrahlung von Poly-C auf 160 kr den Einbau von Prolin bis zu 84 %.

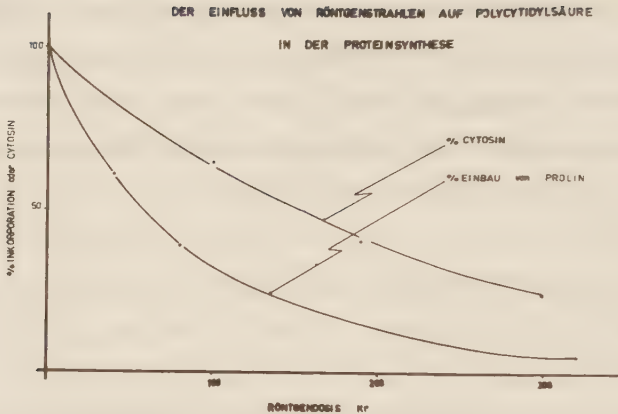


Abb. 26 Poly-C Konzentration im Reaktionsgemisch 400 $\mu\text{g/ml}$, bei der Bestrahlung 1 mg/ml .

5. Einwirkung von Neutronen auf die zellfreie Proteinsynthese.

5.1. Überblick und Aufgabenstellung

Neutronen sind elektrisch neutrale Bestandteile des Atomkerns und besitzen etwa die gleiche Masse wie der Wasserstoffatomkern, das Proton. Neutronen wurden bei der Umwandlung von Atomkernen frei, so entsteht z. B. eine Neutronen-Strahlung, wenn Beryllium mit natürlichen Alphaeteilchen bestrahlt wird. Vermischt man Berylliumpulver mit der alphastrahlenden Radium-

emantion oder emanierendem Radiumsalz, so wird infolge des Auftreffens von Alphateilchen auf die Berylliumkerne ein konstanter Neutronenstrom erzeugt.

Entsprechend der Energie, die den Neutronen innewohnt, unterscheidet man zwischen schnellen und langsamen Neutronen. Schnelle Neutronen besitzen eine Bewegungsenergie bis zu mehreren Millionen Elektronvolt, während die Energie langsamer Neutronen etwa der kinetischen Energie von Gasatomen bei Zimmertemperatur gleichkommt. Die Erzeugung langsamer Neutronen erfolgt unter Ausnutzung des Bremsvermögens leichtatomiger, insbesondere Wasserstoffhaltiger Schichten für schnelle Neutronen. Zu diesem Zweck läßt man schnelle Neutronen durch Wasser oder Paraffin hindurchgehen, wobei die eingestrahlten Neutronen infolge elastischer Zusammenstöße mit den Kernen des Wasserstoffes abgebremst werden. Bei jedem Zusammenstoß geben sie durchschnittlich die Hälfte ihrer Energie an ein Proton ab, bis schließlich ihre Energie nur noch einen Bruchteil der Anfangsenergie beträgt.

Trifft ein schnelles Neutron auf einen ruhenden Kern der Materie, so erhält dieser einen Energiebeitrag, der beim Zusammenstoß des Neutrons mit einem Kern annähernd gleicher Masse, also einem Wasserstoffkern, am größten ist. Das Neutron fliegt nach dem Zusammenstoß in entsprechend veränderter Richtung und mit verringerter Energie weiter. Der gestoßene Kern wird als Rückstoßkern bezeichnet. Im biologischen Gewebe ist Wasserstoff in chemisch gebundener Form reichlich vorhanden. Die infolge

elastischer Stoßprozesse zwischen eingestrahlten Neutronen und den Atomkernen des Wasserstoffes entstehenden Rückstoßprotonen rufen längs ihrer Bahnen Ionisationen in außerordentlicher Dichte hervor.

In der Dosimetrie der Bestrahlung mit Neutronen ist zu beachten, daß die Energieabgabe der Neutronen im wesentlichen von der Anwesenheit spezifischer Elemente, insbesondere des Wasserstoffs, abhängt. Die in der Röntgen- und Radiumdosimetrie gebräuchlichen Methoden, denen die Messung der Ionisation in Luft zugrunde liegt, sind daher nicht ohne weiteres auf die Dosismessung der Neutronen übertragbar. Es ist daher zweckmäßig, anstelle der Luft ein Medium mit einer dem Gewebe ähnlichen chemischen Zusammensetzung zu wählen, z. B. Wasser. Als "Röntgenäquivalent" der Neutronendosis ist diejenige Dosis anzunehmen, die der Absorption von 1 r in 1 g Wasser entspricht. Nach der internationalen Nomenklatur wurde die Neutronen-Einheit "n" als Maß der Neutronendosis gewählt. In ruft in der Fingerhutkammer eines Victoreen-Röntgen-Dosimeters die gleiche Ionisation hervor, wie 1 r Röntgenstrahlung.

Infolge der großen räumlichen Ionisationsdichte der von Neutronen ausgelösten Rückstoßteilchen unterscheidet sich die Wirkung der Neutronenstrahlung auf lebendes Gewebe von der einer Röntgenstrahlung gleicher Dosis. Bei den meisten bisher erforschten strahlenbiologischen Reaktionen ist die Neutronenstrahlung je Dosiseinheit der Röntgenstrahlung überlegen. Es zeigen sich zunächst auch auffallende Sensibilitätsunterschiede

verschiedener Gewebe bezüglich der Neutronenwirkung, insbesondere erschienen bösartige Tumoren der Neutronenbestrahlung gegenüber verhältnismäßig sehr empfindlich ⁴²⁾. Biologische Schädigungen durch Neutronenstrahlen sind ein weitgehend erforschtes Gebiet der Vergangenheit, aber molekulare Veränderungen durch Neutronen wurden bisher kaum untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit über die Wirkung verschiedener Strahlungsarten soll auch der Effekt von Neutronen auf Purine und Pyrimidine bzw. die zellfreie Proteinsynthese untersucht werden.

Ergebnisse und Diskussion.

Wie aus Tab. 7 hervorgeht, sind die Purine Adenin und Guanin etwa dreimal so empfindlich, wie die Pyrimidine Cytosin, Uracil und Thymin. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Röntgen- oder UV-Bestrahlung, wo die Pyrimidine wesentlich empfindlicher sind als die Purine. Da Stickstoff durch Aufnahme eines Neutrons in Kohlenstoff umgewandelt wird, könnte der höhere Stickstoff-Gehalt der Purine für die Neutronenempfindlichkeit verantwortlich sein. Daß es tatsächlich so ist, bestätigen die Versuchsergebnisse, wie sie in Tab. 8 zu sehen sind. Bestrahlt man die Aza-Verbindungen mit Neutronen, so zeigt sich, daß die Empfindlichkeit der Aza-Verbindungen wesentlich höher ist als die der normalen Basen.

Auffallend ist auch die pH-Abhängigkeit der Basenzerstörung mit Neutronen, wobei die größte Labilität bei einem pH-Wert von 5,5 liegt und die größte Stabilität bei einem Wert von pH 1. Mit Ausnahme des Uracils zeigt sich die gleiche pH-Ab-

Tab. 7

Neutronenempfindlichkeit der Purine und Pyrimidine.

Basen	Neutronendosis [$\times 10^{-14}$ n]	
	0,54	2,7
Uracil	12	50
Cytosin	17	-
Thymin	9	45
Guanin	57	93
Adenin	75	97

Zahlenangaben: Prozent Abnahme der Extinktion bei max und pH 5,6. Basenkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$, pH 5,6 in Wasser. Neutronenfluß 3×10^{11} n/sec cm.

hängigkeit wie bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen.

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, beträgt der Extinktionsverlust der Polynukleotide bei den gleichen Neutron-Dosen etwa die Hälfte von dem der freien Basen. Die Reihenfolge der Basenempfindlichkeit ist jedoch die gleiche: Poly-A wird mehr zer-

stört als Poly-U oder Poly-C. Verwendet man die mit Neutronen bestrahlten Polynukleotide für die Inkorporation der Aminosäuren Phenylalanin, Prolin und Lysin, so zeigt sich in Abhängigkeit der Extinktionsabnahme, d. h. der Basenzerstörung, eine Hemmung der Proteinsynthese. Die größte Schädigung weist die Inkorporation von Lysin auf, gefolgt von der für Phenylalanin und Prolin.

Tab. 8

Neutronenempfindlichkeit der Basen.

Zahlenangaben: % Abnahme der Extinktion bei max.

Basen	% N	Neutronendosis [$\times 10^{-14}$ n]	
		0,18	1,62
Uracil	24,99	4	23
Azaauracil	39,00	12	29
Guanin	46,33	13	52
Azaguanin	55,00	22	53
Basenkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$, pH 1, in Wasser.			
Basen	1,0	pH-Wert	
		5,5	13
Uracil	2	50	8
Adenin	64	98	70

Tab. 9 pH-Abhängigkeit der Basenzerstörung durch Neutronen.

Zahlenangaben: % Abnahme der Extinktion. Neutronendosis $2,7 \times 10^{-14}$ n. Basenkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$.

Tab. 10

Neutronenempfindlichkeit von Polynukleotiden

Polynukleotid	Neutronendosis ($\times 10^{-13} n$)		
	3,6	7,2	18,0
Poly-U	10		12
Poly-C	12		17
Poly-A	27		36
DNS (Lachs-Sperma)		13	
t-RNS (<u>E. coli</u>)			27

Prozent Abnahme der Extinktion bei -max und pH 5,6. Konzentration der Polynukleotide, DNS und t-RNS 1 mg/ml.

Tab. 11

Neutronenempfindlichkeit der m-RNS bei der Proteinsynthese
mit Phenylalanin, Prolin und Lysin.

Polynukleotid bestrahlt mit	Neutronendosis [$\times 10^{-13}$ n]		
	1,8	3,6	7,2
Poly-U (Phenylalanin)	18		38
Poly-C (Prolin)	17	53	
Poly-A (Lysin)	42	75	

Zahlenangaben: % Hemmung des Aminosäure-Einbaues. Konzentration der Polynukleotide beim Bestrahlen: 1 mg/ml, bei der Proteinsynthese Poly-U 80 μ g/ml, Poly-C 350 μ g/ml und Poly-A 120 μ g/ml.

6. Methodik

6.1. Durchführung der Bestrahlungen:

UV-Licht

Als UV-Strahlenquelle diente eine Quecksilberniederdrucklampe NN 30/89 der QUARZLAMPENGESELLSCHAFT MBH., Hanau.

Brennerleistung 30 W, Strahlenfluß bei 253,7 μ 10 W, Länge des Lichtbogens 790 mm.

Relative spektrale Energieverteilung:

Wellenlänge μ	254	297	366	405	436
relative Energie	100	0,6	2,0	2,0	4,0

Die Lampe strahlt also praktisch nur Licht der Wellenlänge 253,7 μ aus. Die abgestrahlte Leistung pro Flächeneinheit beträgt in 6 cm Abstand $1,2 \times 10^4$ erg/mm min. Die Proben wurden in offenen Petrischalen im Kühlraum bestrahlt. Die Schichtdicke der Lösungen variierte zwischen 1 - 3 mm.

Monochromator: Gitter-Monochromator (BAUSCH & LOMB, Rochester)

Sichtbares Licht

Als Strahlenquelle wurde eine Quecksilberdampflampe HPR 125 W der DEUTSCHEN PHILIPS GmbH verwendet.

Absolute Energieverteilung:

Wellenlänge μ	313	391-408	436	546	578
Absolute Energie W	0,1	1,0	1,6	2,0	2,0

Die Proben wurden in Reagenzgläsern in einem Wasserbad bestrahlt, das auf etwa 12°C gehalten wurde. Die Bestrahlung erfolgte durch zwei Lampen, die sich im Abstand von jeweils 5 cm zur Probe gegenüber standen.

Röntgenstrahlen

Als Strahlenquelle wurde eine Hochleistungs-Röntgenröhre (RT-100) der Firma F. H. MÜLLER, Hamburg, verwendet. Die Bestrahlung der Proben erfolgte in offenen Petrischalen, die Schichtdicke betrug 1 - 3 mm.

Die Instrumentdaten der Röntgenröhren lauteten: Rotierende Wolframanode, Berylliumfenster, Strahlung ungefiltert, bei Spannung 100 kV und Rohrstrom 8 mA Leistung von 30 kr/min. in 10 cm Abstand.

Bestrahlung mit Neutronen

Als Neutronenquelle diente der Reaktor des Instituts für Kernphysik, Frankfurt am Main. Bei einer Reaktorleistung von 50 KW betrug der thermische Neutronenfluß in den Aktivierungskanälen 3×10^{11} n/sec cm². Die Lösungen wurden zuerst in Quarzampullen eingeschmolzen und in Aluminiumkapseln gesteckt. Dann wurden die Proben mit Neutronen bestrahlt.

6.2. Herstellung von zellfreiem Extrakt aus E. coli B.

Medium: Citratmedium ⁶⁸⁾, bestehend aus: 2,5 g K₂H PO₄, 25 g Na-citrat, 20 g Glukose, 10 mg Adenin, 10 mg Guanin, 10 mg Uracil, 100 mg Asparaginsäure, 200 mg Alanin, 10 g Bactocason, 50 ml einer Vitamin- und 5 ml Salzlösung auf 1000 ml Wasser. Dazu werden 7 g Bacto Yeast Extract (DIFCO LABORATORIES) zugegeben. Die Vitaminlösung enthält 8 mg B-1, 8 mg B-2, 48 mg B-6, 24 mg Nicotinsäure, 16 mg Pantothensäure und 16 mg Biotin in 2 l. Die Salzlösung enthält 10 g MgSO₄.

$7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g NaCl, 0,5 g Fe-Citrat und $0,33 \text{ g MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
in 250 ml.

Die Bakterien wurden während der log-Phase abzentrifugiert und 2-mal mit 0,01-m Trispuffer pH 7,8, der zusätzlich 0,01 mMol Magnesiumacetat und 0,06 mMol Kaliumchlorid pro ml enthielt, gewaschen. Die Bakterien wurden nochmals mit der gleichen Pufferlösung gewaschen, die außerdem 0,006 mMol/ml Mercaptoäthanol enthielt. Danach wurden die Bakterien im 2,5-fachen Volumen des zuletzt benutzten Puffers suspendiert und die 1,5-fache Gewichtsmenge Glasperlen hinzugefügt. Diese Suspension wurde 2 Minuten im Vibrator (B. BRAUN, Melsungen) bei 0°C geschüttelt und danach die Zelltrümmer 20 Minuten bei 30000 xg und 2°C abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dekantiert, mit $3 \mu\text{g/ml}$ DNase versetzt und nochmals 20 Minuten bei 30000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde ein drittes Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der resultierende Überstand (S-30 Fraktion) wurde weiter in einer Spinco Zentrifuge bei 105000 xg 2 Stunden lang zentrifugiert. $2/3$ des Überstands (S-100 Fraktion) wurden vorsichtig dekantiert. Der Rückstand (die Ribosomen) wurde mit dem Mercaptoäthanol-haltigen Trispuffer gewaschen und nochmals in der Spinco abzentrifugiert.

6.3. Isolierung der t-RNS aus E. coli B ^{31, 78)}.

Die Transfer-RNS wurde aus der S-100 Fraktion von E. coli B nach der Methode von KIRBY ³¹⁾ isoliert, die Reinigung wurde nach ZUBAY ⁷⁸⁾ durchgeführt: 100 g Bakterien wurden in 200 ml

0,01m-Magnesiumacetat + 0,001m-Trispuffer pH 7,4 suspendiert. Zu der Suspension wurden gleiche Mengen von Phenol: Wasser (80:20) zugegeben und 60 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Mischung wurde bei 1800 xg 30 Minuten lang zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene t-RNS wurde durch 0,1 Vol. 20 % Kaliumacetat und 2 Vol abs. Äthanol bei -20° gefällt. Der Niederschlag wurde in 100 ml 1m-Kochsalzlösung gefällt. Der Niederschlag wurde in 0,5m-Trispuffer pH 9,8 gelöst und 45 Minuten bei 37° inkubiert. Zu der Lösung wurden gleiche Mengen von 1m-Kochsalzlösung gegeben und die t-RNS nochmals mit 2 Vol. Äthanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 0,3m-Natriumacetat-Lösung gelöst und mit 0,54 Vol Isopropanol versetzt. Der resultierende Niederschlag wurde abzentrifugiert, in 35 ml 0,3m-Natriumacetat gelöst und wiederum 0,54 Vol. Isopropanol zugegeben. Beide Überstände wurden vereinigt und 0,25 Vol Isopropanol zugegeben. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in destilliertem Wasser gelöst und über Nacht bei 5°C dialysiert. Die dialysierte Lösung von t-RNS wurde lyophilisiert.

6.4. Herstellung von ^{14}C -Aminoacyl-t-RNS.¹⁹⁾

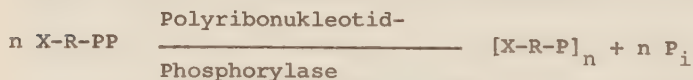
Zur Entfernung der t-RNS aus der Enzymfraktion (S-100) wurden 10 ml der Fraktion auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 5 cm) gegeben, die vorher mit einem 0,006m-Mercaptoäthanol enthaltenden 0,1m-Trispuffer (pH 7,5) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 10 ml Trispuffer nachgewaschen. Die Eluate wurden vereinigt und über Nacht gegen 0,006m-Mercaptoäthanol enthaltenden 0,01m-Trispuffer (pH 7,4) dialysiert. Die so erhal-

tene Enzymlösung wurde für die Herstellung der ^{14}C -Aminacyl-t-RNS verwendet.

Das Reaktionsgemisch (2 ml) enthielt in μMol : Trispuffer pH 7,2 (200), Magnesiumchlorid 20, ATP 5, GSH 8. Außerdem (100 μg Protein), 8 mg t-RNS und 0,04 μMol der ^{14}C -Aminosäure. Das Gemisch wurde bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml destilliertem Phenol gestoppt, die Lösung bei Zimmertemperatur 10 Minuten lang geschüttelt und schließlich bei 5° abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Aminoacyl-t-RNS wurde durch 0,1 Vol. 20 % Kaliumacetat und 2 Vol. Äthanol bei -20° gefällt. Der Niederschlag wurde 2-mal mit 70%igem Äthanol gewaschen und in destilliertem Wasser gelöst.

6.5. Synthese der Polynukleotide.

Die Polynukleotide von verschiedenen Basenzusammensetzungen wurden aus Nukleosiddiphosphaten nach OCHOA hergestellt:



Die Enzym-Polyribonukleotid-Phosphorylase wurde aus Micrococcus lysodeikticus hergestellt. 20 g Aceton-getrocknete Zellen wurden in 200 ml 0,5%iger Natriumchlorid-Lösung suspendiert und auf pH 8,0 eingestellt. Die Suspension wurde bei 37° inkubiert und 50 mg Lysozym (WORTHINGTON) in 2 ml Lösung zugegeben. Die Suspension wurde so lange inkubiert, bis sie dunkel wird und

dann geschüttelt. Sättigung nach Zugabe von 100 ml bei Zimmertemperatur. Ammoniumsulfat-Lösung wurde nochmals geschüttelt bei 20000 xg 30 Minuten bei 4° zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert, in 20 ml 0,1M-Trispuffer (pH 8,0) gelöst und gegen destilliertes Wasser über Nacht dialysiert. Die so erhaltene Enzymlösung wurde zur Polymersisation der Nukleotide verwendet.

Die benötigten Diphosphate wurden von der SCHWARZ BIORESEARCH, INC., (USA) bezogen. Das Reaktionsgemisch für die verschiedenen Polymeren war im wesentlichen gleich, die Ausfällungsmethoden waren jedoch unterschiedlich. Das Reaktionsgemisch enthielt: Nukleosiddiphosphate 25 μ Mol, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 100 μ Mol, Harnstoff 4 mMol, Mercaptoäthanol 250 μ Mol, Enzym 1-4 mg Protein, Gesamtvolumen 10 ml. Das Reaktionsgemisch für die Poly-A-Synthese enthielt außerdem 50 μ Mol ATP und 2,5 ml gesätt. Ammoniumsulfat-Lösung.

Der Verlauf der Reaktion wurde durch Bestimmung des Gehalts an anorganischem Phosphat im Reaktionsgemisch verfolgt. Bei Erreichen des höchsten Phosphatgehalts wurden die Polynukleotide ausgefällt. Bei der Polymerisation von Poly-A ist eine Phosphatbestimmung überflüssig, da sich nach einer optimalen Reaktionszeit (30 Min) ein Niederschlag bildet. Dann wurde 1ml 2M Magnesiumacetatlösung zugegeben und noch 30 Minuten inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Wasser gelöst und nochmals zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde mit gesätt. Ammoniumsulfatlösung versetzt, der Niederschlag in Wasser gelöst und dialysiert. Bei der Polymerisation anderer Polynukleotide wurden die Reaktionen bei Erreichen eines maximalen Anstiegs des Phosphatgehalts gestoppt. Nach der Reaktionszeit wurden 0,1 ml 2m Magnesiumacetat und 0,1 ml gesätt. Ammoniumsulfatlösung zugegeben und nochmals 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann gekühlt und 2 Vol. 3m Kaliumchlorid zugegeben. Das Polynukleotid wurde mit 0,2 Vol. abs. Äthanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und dialysiert.

6.6. Einbau der Aminosäuren.

Das Reaktionsgemisch enthielt (in $\mu\text{Mol/ml}$): Tris 100, Magnesiumacetat 10, Kaliumchlorid 50, Mercaptoäthanol 6, Phosphoenolpyruvat 5, Pyruvatkinase 20 μg , ATP 5, ^{14}C -Aminosäure 0,02, Enzym Fraktion (S-30) 0,1 ml oder S-100 Fraktion 0,05 ml und ribosomale Fraktion 0,05 ml. Gesamtvolumen 0,25 ml. Die Konzentration der m-RNS für verschiedene Aminosäuren war unterschiedlich, z. B. Phenylalanin (80 μg Poly-U/ml), Prolin (350 μg Poly-C/ml, Lysin (120 μg Poly-A/ml).

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37° inkubiert. Nach 10 und 20 Minuten wurden je 0,1 ml aus dem Gemisch auf Papierplättchen ($\varnothing$ 3,5 cm) aufgetragen. Die Papierplättchen wurden sofort mit warmer Luft getrocknet und zur Fällung der Proteine mit 10%iger Trichloressigsäure (Polyphenylalanin), mit 40%iger Trichloressigsäure (Polyprolin) bzw. mit 0,5%iger Wolframsäure enthaltender 10%iger Trichloressigsäure (Polylysin) be-

handelt. Die Papierplättchen blieben mindestens 3 Stunden in den Ausfällungslösungen, dann wurde mit 5%iger Trichlor-essigsäure (Phenylalanin-Einbau), mit 20%iger Trichloressigsäure (Prolin-Einbau) bzw. 0,25%iger Wolframsäure enthaltender 5%iger Trichloressigsäure (Lysin-Einbau) 3-mal gewaschen. Die Papierplättchen wurden dann 2 mal je 30 Minuten in Äthanol:Äther (1:1) gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie in ein Messglas aus ^{40}K -armem Glas gesteckt und 5 ml eines Toluol-Scintillators folgender Zusammensetzung zugegeben:

1 l Toluol,
4 g 2,5 Diphenyloxyzol (PPO)
100 mg 2.2'-p-Phylen-bis (5-phenyloxyzol)

Die Proben wurden im PACKARD Scintillationszähler gemessen. Unter optimalen Bedingungen erreicht man in dieser Anordnung für ^{14}C eine Zählausbeute zwischen 65-70 %.

6.7. Elektrophoretische Trennung der Nukleinsäurebasen.

Polynukleotide oder Nukleinsäuren wurden mit 0,3n KOH 18 Stunden lang bei 37° hydrolysiert. Die Lösungen wurden mit Perchlorsäure neutralisiert, und der Niederschlag abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL, 2043 b) aufgetragen und in Ammoniak-Formiat Puffer pH 3,52 (11,3 ml 98%ige Ameisensäure und 10 ml konz. Ammoniak in 5 l Wasser) bei 1900 Volt 90 Minuten lang elektrophoretisch getrennt.

Chromatographische Trennung der Nukleinsäurebasen.

Polynukleotide wurden mit Perchlorsäure (70-72 %) 60 Minuten auf 100°C erhitzt. Die Mischung wurde gekühlt und mit 3 Vol. Wasser verdünnt. Dann wurde geschüttelt und der Niederschlag abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL, 2043 b) aufgetragen und im System Butanol:Wasser (84:14) chromatographiert.

7. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Photochemie der Nukleinsäuren und Pyrimidinnukleotide ist in den letzten Jahren intensiv bearbeitet worden. Gemessen an den Erfolgen der Photochemie der Desoxyribonukleinsäure befindet sich die Ribonukleinsäure-Photochemie noch in den Anfängen. Daß die DNS die genetische Information überträgt, ist schon lange bekannt, daß diese Information aber durch Messenger-Ribonukleinsäure (m-RNS) an den Ort der Proteinsynthese überführt wird, weiß man erst aus den Versuchen von NIRENBERG und MATTHAEI. In der vorliegenden Arbeit werden Experimente über die Strahlenempfindlichkeit der Messenger- und Transfer-Ribonukleinsäuren bei der zellfreien Proteinsynthese beschrieben, die zur Klärung der Wirkungsweise verschiedener Strahlungsarten auf die komplexen Vorgänge der Proteinsynthese beitragen.

Die durchgeführten UV-Bestrahlungsversuche bestätigten, daß die Pyrimidine Uracil und Cytosin wesentlich empfindlicher sind als die Purine Adenin und Guanin. Die Inaktivierung der Polyuridylsäure (Poly-U) durch UV-Licht läßt sich auch anhand des Einbaus von Phenylalanin zeigen. Bei den Versuchen mit

Mischpolymeren stellte sich heraus, daß Cytosin wie auch Adenin in einem Mischpolymerisat mit Uracil eine gewisse Resistenz gegenüber UV-Licht bewirken. Auffällig ist, daß, obwohl Adenin im Vergleich zu Cytosin strahlenchemisch nicht verändert wird, ein Mischpolymerisat von A und U (1:6) weniger resistent ist als ein CU-Polymerisat (1:4). Der Grund dafür könnte der unterschiedliche Uracilgehalt der Mischung sein. Da bekannt ist, daß Uracil unter dem Einfluß von UV-Licht zwei Photoprodukte, ein Dimeres und ein Wasseranlagerungsprodukt bildet, wurde eine Rückwandlung dieser Photoprodukte versucht. Wie aus den vorliegenden Versuchen hervorgeht, wurde eine Reaktivierung der UV-inaktivierten Poly-U durch Dehydratisierung beobachtet. Aufgrund der früheren Beobachtungen von WACKER und Mitarbeitern ⁶⁹⁾, daß eine Rückspaltung der Thymindimeren durch Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat und sichtbares Licht möglich ist, wurden hier ebenfalls derartige Photoreaktivierungs-Versuche UV-bestrahlter Poly-U unternommen. Die Ergebnisse zeigten eine Photoreaktivierung UV-inaktivierter Poly-U durch Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat und sichtbares Licht, die auch anhand des Einbaus von Phenylalanin nachgewiesen werden konnte. Durch den kinetischen Ablauf der Reaktivierungs-Versuche UV-bestrahlter Poly-U durch Dehydratisierung und photochemisch durch Wasserstoffperoxyd oder Uranylacetat konnte gezeigt werden, daß bei hohen UV-Dosen mehr Wasseranlagerungsprodukt gebildet wird, dagegen bei niedrigen UV-Dosen mehr Dimeres. Das ist in guter Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von WACKER et al ⁶⁹⁾ die radioaktives Uracil mit UV bestrahlten und dann die Photo-

produkte analysierten. Erneute Bestrahlung bei 240 μ zeigte ebenfalls eine kleine Reaktivierung der UV-bestrahlten (253,7 μ) Poly-U.

Untersuchungen über die UV-Empfindlichkeit der Transfer- RNS (t-RNS) und der Ribosomen beim Einbau von Phenylalanin zeigten, daß t-RNS gegen UV-Licht wesentlich resistenter ist als die m-RNS (UUU). Wenn man annimmt, daß zu jedem m-RNS Codon in der t-RNS ein Anticodon existiert, müßte AAA dieses Anticodon für UUU sein. Es wurde deshalb versucht, die so unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit des Adenins und Uracils auszunutzen, um eine Aussage über das Code-Anticode-Problem machen zu können. Hierzu wurde auch das zum Phenylalanin-Einbau " spiegelbildliche " System des Lysineinbaus untersucht. Aufgrund früherer Versuche ist bekannt, daß Poly-A (AAA) bei der Polymerisation von Lysin als m-RNS dient. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß die Beladung der t-RNS mit der Aminosäure vor der Bestrahlung erfolgte. Die Ergebnisse zeigten, daß die t-RNS für Phenylalanin wesentlich strahlenresistenter ist als die t-RNS für Lysin. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß in der t-RNS für Phenylalanin ein Anticodon AAA, in der t-RNS für Lysin das Anticodon UUU vorhanden ist. Bestrahlt man dagegen Poly-C, so findet man neben Inaktivierung des Prolin-Einbaus auch eine Stimulierung des Serin- und in geringem Maße auch des Leucin- und Phenylalanin-Einbaus. Die bevorzugten Codons sind für Prolin CCC, für Serin UCC, für Leucin UUC und für Phenylalanin UUU. Unter Bezugnahme auf diesen Befund und die strahlenchemische Veränderung des

Cytosins in Uracil und Uracil-Dimeres lassen sich die vorstehenden Ergebnisse wie folgt erklären: Die Inaktivierung des Prolin-Einbaus dürfte auf die Bildung von CCU zurückzuführen sein. Das bestätigt auch die Aktivierung des Serin-Einbaus, die durch Umwandlung eines Cytosin- in ein Uracil-Molekül möglich wird. Die weitere Bestrahlung des Serin-Codes dürfte zur Uracil-Dimerisierung führen. Bei Leucin dürfte es ähnlich sein wie bei Serin. Da jedoch zwei Uracil-Moleküle für die Inkorporation von Leucin notwendig sind, erfolgt eine Stimulierung des Leucin-Einbaus nach Umwandlung zweier Cytosin-Moleküle bei Bestrahlung mit höheren UV-Dosen. Da Leucin nicht so hoch sein kann wie Serin läßt sich vermuten, daß eine Inaktivierung des Uracil-Codes stattgefunden hat. Dies gilt auch in einem geringen Maße für den Einbau von Phenylalanin. Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse findet man in der kürzlich erschienen Arbeit von ONO, WILSON und GROSSMAN⁸⁰⁾, wo sie zeigten, daß Poly-C ebenfalls nach der UV-Bestrahlung seine Primer-Aktivität bei der DNS-abhängigen-RNS-Polymerase verliert. Die schematische Darstellung ist aus Abb. 27 zu sehen.

Mit photodynamischen Untersuchungen war in jüngster Vergangenheit nachgewiesen worden, daß Thiopyronin in Verbindung mit sichtbarem Licht vorzugsweise Guanin oxidative zerstört. Da UV-Licht die Purine Adenin und Guanin nicht beeinflußt, war es im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen von Interesse, die Guanin-haltige Codons mit sichtbarem Licht bei Gegenwart von Thiopyronin zu bestrahlen und danach ihre Aktivität bei der Proteinsynthese zu

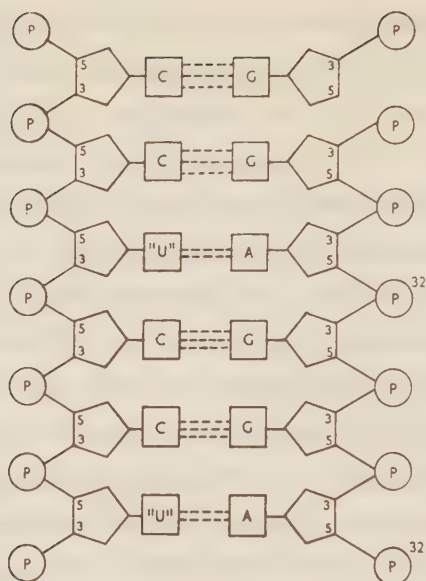


Abb. 27 Schematische Darstellung der misch-Polymeren nach der UV-Bestrahlung des Poly-C (80).

untersuchen. Hierzu wurde die m-RNS AAG mit einem A:G Verhältnis (5:1) für den Einbau von Lysin verwendet. Die Versuche zeigten, daß die Bestrahlung von AAG als m-RNS beim Lysin Einbau zu einem größeren Aktivitätsverlust führt. Daneben zeigte sich, daß die t-RNS beim Leucin-Einbau (m-RNS= UUC) photodynamisch empfindlich ist, was ein Hinweis auf den hypothetischen Anticod AAG geben könnte. Eine deutliche Empfindlichkeit gegen die Bestrahlung mit sichtbarem Licht und Thiopyronin zeigten auch die Ribosomen. Ob diese Empfindlichkeit mit der Rolle des GTP bei der Proteinsynthese zusammenhängt, ist nicht ersichtlich.

Psoralen und Xanthotoxin, die bei der Abtötung von Bakterien und Phagen photodynamisch hoch wirksam sind, benötigen im Gegensatz zu Thiopyronin keinen Sauerstoff, woran geschlossen werden kann, daß der Wirkungsmechanismus dieser beiden Furocumarine grundsätzlich von dem des Thiopyronins verschieden ist. Die mit den beiden photodynamisch-aktiven Substanzen und sichtbarem Licht durchgeführten Versuche gestatten jedoch keinen wesentlichen Einblick in das Problem Code-Anticod. Die in beiden Fällen eingetretene Inaktivierung der Ribosomen könnte mehr mit dem Proteinanteil der Ribosomen zusammenhängen, als mit einer spezifischen, strahlenchemischen Veränderung des Guanins.

Die Tatsache, daß Röntgenstrahlen spezifisch auf die Pyrimidine und Purine einwirken, wurde von Wacker und Mitarbb. ^{70a)} entdeckt. Sie feststellen konnten, daß Pyrimidine wesentlich empfindlicher sind als Purine und daß bei den Purinen Adenin im Vergleich zu Guenin auch bei hohen Strahlendosen nur wenig zerstört wird. Aufgrund dieser unterschiedlichen Empfindlichkeit, war es von Interesse, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die Empfindlichkeit zusammengesetzter Polynukleotide gegen Röntgenstrahlen direkt und in Verbindung mit der Proteinsynthese zu untersuchen.

Ein Blick auf die Versuchsergebnisse zeigt, daß ein Mischpolymer der beiden Pyrimidine U und C keine wesentliche Veränderung in der Empfindlichkeit gegenüber den Homopolymeren aufweist, dagegen aber, eine Hinzufügung von Adenin entweder zu Uracil (AUU) oder Uracil:Cytosin (UAC) eine wesentliche Zunahme

der Resistenz zur Folge hat. Dies gilt insbesondere für die kleinere Röntgendosis von 120 kr zu und stimmt mit der von WACKER und Mitarbb. ^{70a)} gefundenen Empfindlichkeit der einzelnen Basen überein. Versuche mit der Proteinsynthese ergaben, daß die von Poly-U und Poly-C abhängige Polymerisation von Phenylalanin und Prolin wesentlich mehr gestört wird, als die Bildung von Polylysin mit Poly-A. Weiterhin ist auffällig, daß die Proteinsynthese wesentlich empfindlicher ist, als die Zerstörung der Basen in den Polynukleotiden. Da aber die Kettenlänge der Polynukleotide die Proteinsynthese beeinflusst ^{27a)}, mußte sich auch eine Verkürzung der Ribose-Phosphatkette durch Röntgenstrahlen auf die Proteinsynthese hemmend auswirken. Man kann aber annehmen, daß die Ribosephosphatkette der verschiedenen Ribonukleinsäuren etwa im gleichen Ausmaß zerstört wird, so daß die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit des Einbaus von Phenylalanin und Prolin einerseits und Lysin andererseits nur auf die unterschiedliche Zerstörung der Basen Uracil, Cytosin und Adenin in den Codonen zurückzuführen ist. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit wurde auch bei der Bestrahlung von t-RNS bei der Proteinsynthese mit Phenylalanin und Lysin beobachtet. Die Versuche zeigen, daß die t-RNS für Lysin wesentlich empfindlicher als die t-RNS für Phenylalanin ist. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis dafür sein, daß in der t-RNS für Phenylalanin tatsächlich ein Anticodon AAA vorhanden ist und in der t-RNS für Lysin das Triplet UUU.

Angeregt durch die physikalisch-chemischen Untersuchungen von WEISS ^{76a)} hat OTTO WARBURG ^{75a)} in den letzten Jahren eine Reihe

von Ergebnissen veröffentlicht, in denen er sich mit der strahlenchemischen Äquivalenz der Wasserstoffperoxyds beschäftigt. Er kommt dabei zu dem Schluß, daß die Wirkung der Röntgenstrahlen bei biologischen Systemen durch die strahlenchemische Bildung von Wasserstoffperoxyd erklärt werden kann. Wie aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen hervorgeht, kann dieser Schluß nicht als allgemeingültig angesehen werden. Die Behandlung von Poly-U zeigt nämlich einen entgegengesetzten Effekt. Wasserstoffperoxyd mit einer Röntgenäquivalenz-Dosis von $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ = 48 kr hemmt die Proteinsynthese nicht, sondern bewirkt im Gegenteil eine geringe, aber wiederholt festgestellte Förderung des Phenylalanin-Einbaus.

Untersuchungen mit Neutronen zeigten, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen der Röntgenstrahlen die Purine Adenin und Guanin etwa dreimal so empfindlich sind wie die Pyrimidine Cytosin, Uracil und Thymin. Eine Erklärung für diesen auffälligen Unterschied gibt wahrscheinlich der im Vergleich höhere Stickstoff-Gehalt der Purine zu den Pyrimidinen. Da Stickstoff durch Aufnahme eines Neutrons in Kohlenstoff umgewandelt wird, könnte hierdurch höhere Neutronenempfindlichkeit der Purine bewirkt werden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, ist die Reihenfolge der Basenempfindlichkeit bei den Polynukleotiden die gleiche, wie bei den freien Basen. Verwendet man die mit Neutronen bestrahlte Polynukleotide für die Inkorporation der Aminosäuren Phenylalanin (Poly U), Prolin (Poly C) und Lysin (Poly A), so zeigt sich in Abhängigkeit von der Basen-zerstörung eine Hemmung der Proteinsynthese. Die größte Schädigung weist die Inkorporation von Lysin auf, gefolgt von der für Prolin und Phenylalanin.

8. Schlussbetrachtung.

Wie die Versuche mit den verschiedenen Strahlenarten und den Neutronen zeigten, besitzen die Purine jeweils eine andere Empfindlichkeit als die Pyrimidine. Das ändert sich auch nicht, wenn die Basen in den Polynukleotiden oder Nukleinsäuren bestrahlt werden. Damit wird, wie dies auch aus den mitgeteilten Ergebnissen hervorgeht, eine weitere Möglichkeit für eine Sequenzanalyse der Basenbausteine der Nukleinsäure erschlossen. Darüberhinaus ist es nunmehr auch möglich, biologische Strahleneffekte chemisch zu erklären, wie z.B. die Abhängigkeit der Röntgenempfindlichkeit einer Bakterienzelle vom Guanin/Cytosin Gehalt oder die Strahlensensibilisierung mit Bromuracil.- Die UV-Bestrahlung von Poly-C erbrachte einen Hinweis für ein mutagenes Geschehen. Das nicht bestrahlte Triplett CCC baut die Aminosäure Prolin gut in einer Polypeptid ein, dagegen die Aminosäure Serin weniger gut. Nach der UV-Bestrahlung mit $2,4 \times 10^5 \text{ erg/mm}^2$ sinkt der Prolin-Einbau um 80%, der Serin-Einbau dagegen steigt um 60%. Die strahlenchemische Erklärung hierfür ist die Umwandlung von Cytosin in Uracil.- Erstmals konnte die molekular-biologische Wirkung von Neutronen auf das genetische Material und die Proteinsynthese gezeigt werden. Interessant dabei ist der Befund, daß die Neutronenempfindlichkeit von dem Stickstoffgehalt der Purine und Pyrimidine abhängt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALPERT, T. : Disc. Faraday Soc. 12, 266 (1952)
2. BASS, L.W. : J. Am. Chem. Soc. 46, 190 (1924)
3. BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 77, 729 (1958)
4. BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 78, 247 (1959)
5. BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 78, 879 (1959)
6. BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 78, 883 (1959)
7. BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 79, 101 (1960)
- 7a. BEUKERS, R.
BERENDS, W. : Biochim. Biophys. Acta 41, 550 (1960)
8. BLUM, H.F. : Biol. Bull. 58, 224 (1930)
9. BLUM, H.F.
WATROUS, W.G.
WEST, R. : Am. J. Physiol. 113, 350 (1935)
10. BRENNER, S. : Proc. natl. Acad. Sci. U.S. 43, 687 (1957)
11. BUCHTA, L. : Zbl. Bakteriologie. II 41, 340 (1914)
12. BUTLER, F.E. : Anal. Chem. 33, 409 (1961)
13. CHARGAFF, E. : Experientia 6, 201 (1950)
14. CRICK, F.H.C.
BARNETT, L.
BRENNER, S.
WATTS-Tobin, S. : Nature (Lond.) 192, 1227 (1961)

15. CRICK, F.H.C.
GRIFFITH, J.
ORGEL, L. : Proc. natl. Acad. Sci. 43, 416 (1957)
- 15a DELLWEG, H.
WACKER, A. : Z. Naturforschg. 17b, 827 (1962)
16. DESSAUER, F. : Z. Physik 12, 38 (1922)
17. DOUDNEY, C.D. : Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 410 (1961)
18. ECKERT, B.
MONIER, R. : Nature 188, 309 (1960)
19. EHRENSTEIN, G.
DAIS, D. : Proc. natl. Acad. Sci. 50, 81 (1963)
20. GALLANT, J.
SUSKIND, S. : J. Bacteriol. 82, 187 (1961)
21. GEIDUSCHEK, E.P.
NAKAMOTO, T.
WEISS, S.B. : Proc. natl. Acad. Sci. 47, 1405 (1961)
22. GROS, F.
HIATT, H.
GILBERT, W.
KURLAND, C.G.
WATSON, J.D. : Nature 190, 581 (1961)
23. Hall, B.D.
SPIEGELMAN, S. : Proc. natl. Acad. Sci. 47, 137 (1961)
24. HARBER, E. : Strahlentherapie 112, 333 (1960)
25. HERZBERG, K. : Z. Immunitätsforschg. 80, 507 (1933)
26. HERZBERG, K.
REUSS, K.
DAHN, R. : Naturwiss. 50, 376 (1963)
27. JONES, O.W.
NIRENBERG, M.W. : Proc. natl. Acad. Sci. 48, 2115 (1962)

- 27a JONES, O.W.
TOWNSEND, E.
SOBER, H.
HEPPEL, L.A. : Biochemistry 3, 238 (1964)
28. JUKES, T.H. in : Informational Molecules. S. 485
Acad. Press New York.
29. KAUTSKY, H. : Ber. dtsch. Chem. Ges. 65, 1762 (1932)
30. KAZIRO, Y.
GROSSMAN, A
OCHOA, S. : Proc. natl. Acad. Sci. 50, 54 (1963)
31. KIRBY, K.S. : Biochem. J. 64, 605 (1956)
32. KNY, L. : Ber. dtsch. Bot. Ges. 2, 129 (1864)
33. LEA, D.E. : Brit. J. Radiol. Supp. 1, 59 (1947)
34. LIN, F.C. : Proc. Soc. Expt. Biol. N.Y. 34, 656 (1936)
35. LOCHMANN, E-R. : Dissertation. Tech. Univ. Berlin(1961)
36. LOHMANN, W. : Dissertation, Rostock (1896)
37. LOWERY, O.H. : J. Biol. Chem. 193, 265 (1952)
38. LWOFF, A. : Proc. Royal. Soc B154, 1 (1961)
39. MIESCHER, F. : Hoppe-Seyler med.chem. Unter. 4,441(1879)
40. MOORE, A.M. : Canad. J. Chem. 36, 281 (1958)
41. MOORE, A.M.
THOMSON, C.H. : Science 122, 594 (1955)
42. NEARY, G.J. : Chronic Rad, Hazards. Pergamon Press 1957.
43. NIRENBERG, M.W.
MATTHAEI, J.H. : Proc. natl. Acad. Sci. 47, 1588(1961)
44. NOMURA, M
HALL, B.D.
SPIEGELMAN, S. : J. Mol. Biol. 2, 306 (1960)
45. NOVELLI, G.D. : Chem. Engg. News. 39, 15 (1961)

46. OCHOA, S.
LENGYEL, P.
SPEYER, J.F. : Proc. natl. Acad. Sci. 47, 1936 (1961)
- 46a OCHOA, S.
MII, S. : J. Biol. Chem. 236, 3303 (1961)
47. OGINSKY, Z.
GREEN, G.S.
GRIFFITH, D.
FOWLKS, W. : J. Bacteriol. 78, 821 (1959)
48. PURRIS, J.B.
WARWICK, G.R. : Proc. Camb. Phil. Soc. 14, 30 (1907)
49. RAAB, O. : Z. Biol. 39, 524 (1900)
50. RÖRSCH, A.
BEUKERS, R.
IJLSTRA, J.
BERENDS, W. : Rec. Trav. Chim. 77, 423 (1958)
51. RUPERT, C.S. : J. Gen. Physiol. 43, 573 (1960)
52. SANGER, F. : Ann. Repts. Prog. Chem. 45, 283 (1949)
53. SANGER, F. in : Currents in Biochemical Res. Edt. Green.
Acad. Press. N.Y. S. 434 (1956)
54. SANGER, F.
TUPPY, H. : Biochem. J. 49, 481 (1951)
55. SCHENK, G.O. : Naturwiss. 43, 71 (1956)
56. SCHOLLES, G
WARD, J. W.
WEISS, J. : J. Mol. Biol. 2, 379 (1960)
57. SIMON, M.I.
VUNAKIS, H. von : J. Mol. Biol. 4, 488 (1963)
58. SINSHEIMER, R.L.
HASTINGS, R.L. : Science 110, 525 (1949)

59. SMETANA, H. : J. Biol. Chem. 124, 667 (1938)
- 59a SHUGAR, D. in : The Nucleic Acids Bd. III. Acad. Press.
Edts. Chargaff u. Davidson. S.39 (1960)
60. SPIEGELMAN, S.
HALL, B.D.
STOCK, R. : Proc. natl. Acad. Sci. 47, 1135 (1961)
61. SWENSON, P.
SETLOW, R.B. : Abst. Biophys. Soc.(1963)
62. SWENSON, P.
SETLOW, R.B. : Photochem. Photobiol. 2, 419 (1963)
63. TAPPEINA, H.
JODELBAUER, A. in: Die sensibilisierende Wirkung fluorscierende
Substanzen. Leipzig. Vogel. (1907)
64. VISCHER, E.
CHARGAFF, E. : J. Biol. Chem. 176, 703 (1948)
65. VOLKIN, E.
ASTRACHAN, L. : Virology 2, 149 (1956)
66. WACKER, A. in : Prog. in Nucleic Acid Res. Acad. Press(1963)
Edts. Chargaff u. Davidson. S. 369
- 66a WACKER, A. in : Vortrag gehalten am 23.XI.1961.
McArdle Mem. Lab., Wisconsin, U.S.A.
67. WACKER, A.
DELLWEG, H. : Unveröffentlicht
68. WACKER, A.
EBERT, M.
KOLM, H. : Z. Naturforschg. 13b, 141 (1958)
69. WACKER, A.
DELLWEG, H.
WEINBLUM, D : Naturwiss. 47, 477 (1960)

- 69a WACKER, A
DELLWEG, H.
TRÄGER, L
KORNHASER, A
LODEMANN, E.
TÜRCK, G.
SELZER, R.
CHANDRA, P.
ISHIMOTO, M. : Photochem Photobiol. 3, 369 (1964)
- 70a WACKER, A.
WEINBLUM, D
LOCHMANN, E-R. : Biophysik 1, 396 (1964)
70. WACKER, A.
DELLWEG, H.
LODEMANN, E. : Angew. Chem. 73, 64 (1961)
71. WACKER, A.
TRÄGER, L.
WEINBLUM, D. : Angew. Chem. 73, 65 (1961)
72. WACKER, A.
TÜRCK, G.
GERSTENBERGER, A : Naturwiss. 50, 377 (1963)
73. WACKER, A.
GERSTENBERGER, A : Angew. Chem. 75, 916 (1963)
74. WACKER, A.
TÜRCK, G. : Unveröffentlicht
- 74a. WACKER, A.
KRAFT, S. : Unveröffentlicht
75. WALL, R. : Nature 193, 1268 (1962)
- 75a. WARBURG, O.H. : Weitere Entwicklung der Zellphysiool. Meth.
Thieme Verlag München. 1962.
76. WATSON, J.D.
CRICK, F.H.C. : Nature 171, 737 (1953)

- 76a WEISS, J. : Nature 153, 748 (1944)
77. WINDISCH, F.
HEUMANN, W.
KRIEGEL, H.
GRAFFI, A : Z. Naturforschg. 8b, 673 (1953)
78. ZUBAY, G. : J. Mol. Biol. 4, 347 (1962)
79. ZUCKERKANDL, E. : J. Mol. Biol. 8, 128 (1964)
80. ONO, J
WILSON, R. G.
GROSSMAN, L. : J Mol. Biol. 11, 600 (1965)

Vorliegende Dissertation wurde im Institut für Therapeutische Biochemie an der Universität Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Adolf Wacker angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Adolf Wacker, möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des Themas und für die weitgehende Unterstützung bei der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Herzlich danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Gerhard-Pfleiderer für seine Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit und für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegen gebracht hat.

Für die finanzielle Unterstützung bin ich Herrn Prof. Dr. Willy Hartner, Direktor der Akademischen Auslandsstelle der Universität Frankfurt, sehr zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

AM 16. Oktober 1936 wurde ich, Prakash Chandra, in Kalkutta als Sohn des 1962 verstorbenen Verlagsdirektors Dr. N.L. Jain und seiner Ehefrau Tara, geb. Gupta, geboren.

Mit dem Abschluszeugnis der Grundschule 1947 trat ich in die Oberschule in Neu-Delhi ein, wo ich das Reifezeugnis der Spezialabteilung im Jahre 1952 erhielt. Im Jahre 1952 trat ich in die Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Delhi ein. Ich erhielt das Abschlußdiplom der Naturwissenschaftlichen Fakultät " B.Sc " mit dem Prädikat " Ausgezeichnet " im Jahre 1956. Meine Prüfungsfächer waren Chemie (Hauptfach), Physik, Mathematik und Biologie. Im Jahre 1956 trat ich als Postgraduate Student in das Institut für Biochemie der Universität Nagpur (Bombay), wo ich den M.Sc (Master Of Science)-Grad unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M.C. Nath absolvierte. 1958 erhielt ich den M.Sc-Grad ebenfalls mit dem Prädikat " Ausgezeichnet ". Meine Prüfungsfächer waren Biophysikalische Chemie, Organische Biochemie, Physiologie und mikrobiologische Biochemie. 1958 erhielt ich ein Forschungs-Stipendium von der Amerikanischen Krebsforschungsanstalt und arbeitete an der Universität California, Berkeley. Mai 1960 bis Juni 1963 arbeitete ich bei Herrn Dr. Hilz an der Institut für Physiologische Chemie der Universität Hamburg, über Radiosulfat - Stoffwechsel in Ratten-Aorta. In-zwischen besuchte ich Universität Kiel für 2 Semestern. Von August 1963 an arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Wacker an meiner Doktorarbeit, die ich in April 1965 abschloss. Meine akademischen Lehrer waren : Dorneich, Dose, Herzberg, Kaplan, Pauly, Pfeleiderer, Rajewsky, Reinholz, Wacker und Wieland.

